

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 930**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/495</b>	(2006.01)	<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/7048</b>	(2006.01)	<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/4965</b>	(2006.01)	<b>A61K 9/20</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/282</b>	(2006.01)	<b>A61K 9/48</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/138</b>	(2006.01)	<b>A61K 47/10</b>	(2007.01)
<b>A61K 31/337</b>	(2006.01)	<b>A61K 9/08</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/704</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/496</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/404</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/553</b>	(2006.01)
<b>A61K 33/24</b>	(2009.01)	<b>A61K 38/05</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/40</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2013 PCT/US2013/029405**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13134407**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2013 E 13757357 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 2822558**

54 Título: **Activación de procaspasa 3 mediante terapia de combinación**

30 Prioridad:

**06.03.2012 US 201261607098 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**23.07.2020**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS (50.0%)**  
**352 Henry Administration Building, 506 South Wright Street**  
**Urbana, Illinois 61801, US y**  
**VANQUISH ONCOLOGY, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HERGENROTHER, PAUL J.;**  
**BOTHAM, RACHEL C.;**  
**FAN, TIMOTHY M.;**  
**GILBERT, MARK J.;**  
**HANDLEY, MICHAEL K.;**  
**ROTH, HOWARD S. y**  
**TARASOW, THEODORE M.**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E INVENCIONES, SLP**

ES 2 774 930 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Activación de procaspasa 3 mediante terapia de combinación

5 **Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica la prioridad a tenor de 35 USC § 119 (e) de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos n.º 61/607.098, presentada el 6 de marzo de 2012.

10 **Antecedentes de la invención**

La apoptosis, o muerte celular programada, desempeña un papel central en el desarrollo y homeostasis de todos los organismos multicelulares. Un sello distintivo frecuente del cáncer es la resistencia a las señales apoptóticas naturales. Dependiendo del tipo de cáncer, esta resistencia se debe típicamente a la regulación positiva o negativa de proteínas clave en la cascada apoptótica o a mutaciones en los genes que codifican estas proteínas. Tales cambios ocurren tanto en la vía apoptótica intrínseca, que se canaliza a través de la mitocondria y la caspasa-9, como en la vía apoptótica extrínseca, que implica la acción de receptores de muerte y caspasa-8. Por ejemplo, las alteraciones en los niveles adecuados de proteínas tales como p53, Bim, Bax, Apaf-1, FLIP y muchas otras, se han observado en cánceres. Las alteraciones pueden conducir a una cascada apoptótica defectuosa, en donde la señal proapoptótica corriente arriba no se transmite adecuadamente para activar las caspasas ejecutoras, caspasa-3 y caspasa-7.

Como la mayoría de las vías apoptóticas implican en última instancia la activación de procaspasa-3, las anomalías genéticas corriente arriba son eficazmente "rupturas" en los circuitos apoptóticos, y como resultado tales células proliferan atípicamente. Dado el papel central de la apoptosis en el cáncer, se han realizado esfuerzos para desarrollar terapias que se dirijan a proteínas específicas en la cascada apoptótica. Por ejemplo, los aglutinantes peptídicos o de moléculas pequeñas a miembros en cascada tales como p53 y proteínas de la familia Bcl o al inhibidor de la familia de proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAP) tienen actividad proapoptótica, al igual que los compuestos que estimulan la oligomerización de Apaf-1. Sin embargo, debido a que tales compuestos se dirigen a dianas tempranas (o intermedias a altas) en la cascada apoptótica, los cánceres con mutaciones que afectan a las proteínas corriente abajo de esos miembros aún pueden ser resistentes a los posibles efectos beneficiosos de esos compuestos.

Sería ventajoso para fines terapéuticos identificar moléculas pequeñas que activan directamente una proteína proapoptótica corriente abajo en la cascada apoptótica. Este enfoque podría implicar una posición relativamente baja en la cascada, permitiendo así eliminar incluso aquellas células que tienen mutaciones que afectan la maquinaria apoptótica corriente arriba. Además, tales estrategias terapéuticas tendrían una mayor probabilidad de éxito si esa proteína proapoptótica estuviera regulada positivamente o estuviera presente en niveles aumentados en las células cancerosas. Por tanto, la identidad de moléculas pequeñas que se dirigen a la proteína efectora corriente abajo de la apoptosis, procaspasa-3, ayudaría significativamente a la terapia actual contra el cáncer.

La conversión o activación de procaspasa-3 en caspasa-3 resulta en generación de la forma de caspasa "ejecutora" activa que posteriormente cataliza la hidrólisis de una multitud de sustratos proteicos. La caspasa-3 activa es un homodímero de heterodímeros y se produce mediante proteólisis de procaspasa-3. *In vivo*, esta activación proteolítica ocurre típicamente a través de la acción de caspasa-8 o caspasa-9. Para garantizar que el zimógeno (proenzima) no se active prematuramente, la procaspasa-3 tiene un "cierre de seguridad" de 12 aminoácidos que bloquea el acceso al sitio ETD (secuencia de aminoácidos, ile-glu-thr-asp) de proteólisis. Este cierre de seguridad permite que la procaspasa-3 resista la activación autocatalítica y la proteólisis de caspasa-9. Los estudios mutagénicos indican que tres restos consecutivos de ácido aspártico parecen ser los componentes críticos del cierre de seguridad. La posición del cierre de seguridad es sensible al pH, así, tras la acidificación celular (como ocurre durante la apoptosis), se cree que el cierre de seguridad permite el acceso al sitio de proteólisis, y la caspasa-3 activa puede producirse por acción de la caspasa-9 o mediante un mecanismo de autoactivación.

En determinados cánceres, los niveles de procaspasa-3 son elevados en relación al tejido normal. Un estudio de aislados primarios de 20 pacientes con cáncer de colon reveló que, en promedio, la procaspasa-3 estaba regulada positivamente seis veces más en dichos aislados en relación al tejido no canceroso adyacente. Además, la procaspasa-3 está regulada positivamente en ciertos neuroblastomas, linfomas, y cánceres hepáticos. Asimismo, se realizó una evaluación sistemática de los niveles de procaspasa-3 en el panel de 60 líneas celulares utilizado para el cribado del cáncer por el Programa de Terapéutica del Desarrollo del Instituto Nacional del Cáncer (NCI), que reveló que ciertos cánceres de pulmón, melanoma, renales y de mama muestran niveles muy elevados de expresión de procaspasa-3.

Debido al papel de la caspasa-3 activa en la consecución de la apoptosis, los niveles relativamente altos de procaspasa-3 en ciertos tipos de células cancerosas y la intrigante supresión mediada por el cierre de seguridad de su autoactivación, las moléculas pequeñas que modifican directamente la procaspasa-3 podrían tener una gran aplicabilidad en la terapia dirigida contra el cáncer.

La terapia de combinación se ha convertido en estándar para el tratamiento de pacientes con cáncer. El objetivo de

los regímenes de cócteles farmacológicos de terapia de combinación es lograr un efecto sinérgico o aditivo entre los compuestos quimioterapéuticos, facilitando así tiempos de tratamiento más cortos, toxicidad disminuida y supervivencia aumentada del paciente. Los fármacos que actúan en una sola vía bioquímica son candidatos particularmente fuertes para la sinergia o potenciación, ya que pueden imitar combinaciones genéticas "letales sintéticas". Por ejemplo, los inhibidores de poli(ADP-ribosa)polimerasa-1 (PARP-1), una enzima que facilita la reparación del daño del ADN, crea una potente sinergia con agentes que dañan el ADN como se demuestra en cultivo celular, modelos animales, y ensayos clínicos en humanos. Sin embargo, aún existe la necesidad de terapias más eficaces para el tratamiento de muchas formas de cáncer, y las nuevas combinaciones sinérgicas de medicamentos contra el cáncer ayudarían a esta búsqueda. Por tanto, existe la necesidad de identificar nuevos agentes citotóxicos que sean eficaces para eliminar células cancerosas pero que protejan los tejidos normales del huésped de la toxicidad no deseada del agente citotóxico.

El documento WO 2008/134474 A2 describe composiciones y métodos relacionados con la inducción de muerte celular tal como en células cancerosas. Se desvelan compuestos y métodos relacionados para la síntesis y uso de los mismos, incluyendo el uso de compuestos en terapia para tratamiento de cáncer e inducción selectiva de apoptosis en células. Los compuestos se desvelan en relación con la modificación de procaspasas tales como procaspasa-3. También se describen composiciones capaces de activar procaspasa-3.

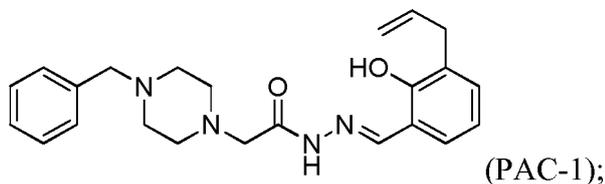
### Sumario

La invención proporciona en general compuestos, composiciones, y describe métodos de tratamiento terapéutico. En diversas realizaciones, las invenciones son aplicables a una variedad de enfermedades cancerosas y tipos de células cancerosas tales como mama, linfoma, adrenal, renal, melanoma, leucemia, neuroblastoma, pulmón, cerebro, y otros conocidos en la técnica. En este documento se desvelan, entre otras cosas, composiciones y métodos que incluyen moléculas pequeñas capaces de inducir muerte celular. En algunas realizaciones, Las composiciones y métodos implican compuestos que pueden interactuar directa o indirectamente con miembros de la vía de muerte celular programada tales como procaspasa-3. En ciertas realizaciones, las composiciones y métodos han reducido la neurotoxicidad en comparación con otros compuestos que interactúan directa o indirectamente con los miembros de la vía de muerte celular programada tales como procaspasa-3.

La terapia anticancerígena de combinación puede consistir en fármacos que se dirigen a diferentes vías bioquímicas, o aquellos que alcanzan diferentes dianas en la misma vía, mimetizando combinaciones genéticas "letales sintéticas". La combinación del activador de procaspasa-3 PAC-1 y un segundo agente activo ha demostrado una considerable sinergia para inducir muerte apoptótica de células cancerosas, a menudo en un grado muy superior al efecto aditivo. La combinación de PAC-1 y un segundo agente activo puede usarse para reducir eficazmente la carga tumoral en modelos tumorales en donde los compuestos solos tienen un efecto mínimo o ningún efecto. Los datos descritos en este documento indican la eficacia de una combinación de PAC-1/segundo agente para el tratamiento de cáncer y, de manera más amplia, muestran que las combinaciones pueden ser sinérgicas y proporcionar beneficios terapéuticos significativamente mayores.

Por tanto, la invención proporciona una composición que comprende:

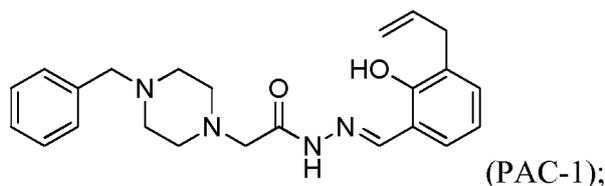
(a) un compuesto PAC-1:



(b) un segundo agente activo; y (c) un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. El segundo agente activo es bortezomib, doxorubicina, tamoxifeno, carboplatino, o paclitaxel.

La invención también proporciona una composición que comprende:

(a) un compuesto PAC-1:



- (b) un segundo agente activo, en donde el segundo agente activo es estaurosporina; y  
 (c) un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable;

5 en donde la concentración del compuesto PAC-1 es 7,5 o 15  $\mu\text{M}$  y la concentración de estaurosporina es 50 nM o 100 nM; o

en donde la concentración del compuesto PAC-1 es 30  $\mu\text{M}$  y la concentración de estaurosporina es 50 nM.

10 El vehículo puede incluir agua y componentes opcionales para suministrar ventajosamente los agentes activos tales como un tampón, un azúcar, agentes de solubilización tales como una ciclodextrina, o varias combinaciones de las mismas. En una realización, la ciclodextrina es 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina.

15 La concentración de PAC-1 puede ser aproximadamente 0,2  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 5 mM, o aproximadamente 2  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ , típicamente aproximadamente 2,5  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 5  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 7,5  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 12,5  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 15  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 20  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 25  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 30  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 40  $\mu\text{M}$ , o aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ , o un intervalo entre cualquiera de los valores mencionados anteriormente, cuando el segundo agente activo es bortezomib, doxorubicina, tamoxifeno, carboplatino, o paclitaxel. La concentración del segundo agente activo puede ser

20 aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1 mM, o aproximadamente 25 nM a aproximadamente 1 mM, típicamente aproximadamente 1 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 250 nM, aproximadamente 500 nM, aproximadamente 750 nM, aproximadamente 900 nM, aproximadamente 1  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 2,5  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 5  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 7,5  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 12,5  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 15  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 20  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 25  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 30  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 40  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 75  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 125  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 150  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 200  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 250  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 300  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 500  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 750  $\mu\text{M}$ , o aproximadamente 1 mM, o un intervalo entre cualquiera de los valores mencionados anteriormente, cuando el segundo agente activo es bortezomib, doxorubicina, tamoxifeno, carboplatino, o paclitaxel.

30

En otra realización, el segundo agente activo puede ser bortezomib y la concentración de bortezomib puede ser aproximadamente 50 nM a aproximadamente 20  $\mu\text{M}$ .

35 En otra divulgación, el segundo agente activo puede ser estaurosporina y la concentración de estaurosporina puede ser aproximadamente 25 nM a aproximadamente 200 nM.

En otra realización, el segundo agente activo puede ser doxorubicina y la concentración de doxorubicina puede ser aproximadamente 50 nM a aproximadamente 5  $\mu\text{M}$ .

40 En otra realización, el segundo agente activo puede ser tamoxifeno y la concentración de tamoxifeno puede ser aproximadamente 5  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ .

45 En otra realización, el segundo agente activo puede ser carboplatino y la concentración de carboplatino puede ser aproximadamente 5  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 150  $\mu\text{M}$ .

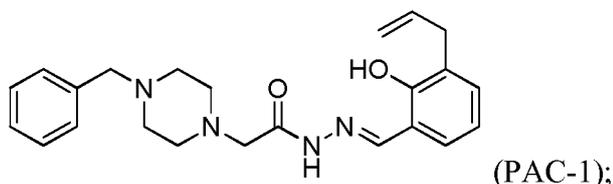
En otra realización, el segundo agente activo puede ser paclitaxel y la concentración de paclitaxel puede ser aproximadamente 0,5 nM a aproximadamente 15 nM.

50 La invención también proporciona una combinación de un compuesto PAC-1 y un segundo agente activo para uso en el tratamiento de un cáncer en un paciente, en donde la composición es una cantidad eficaz de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en este documento, y en donde dicho uso comprende poner en contacto células cancerosas con una cantidad eficaz del compuesto PAC-1 y el segundo agente activo descritos en este documento, inhibiendo así el crecimiento o la proliferación de células cancerosas. En algunas realizaciones, las células cancerosas pueden ser células de linfoma, células de osteosarcoma, células de cáncer de mama, o células de cáncer

55 de ovario. En otra realización, las células cancerosas son otro tipo de células que se describen posteriormente en este documento.

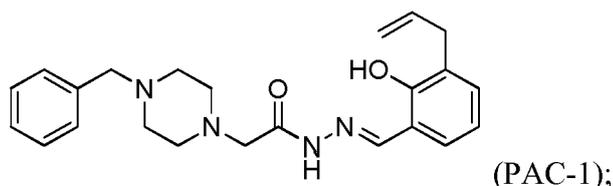
La divulgación proporciona además un método para inducir apoptosis en una célula cancerosa que comprende poner

en contacto la célula cancerosa con una cantidad eficaz del compuesto PAC-1:



5 y una cantidad eficaz de un segundo agente activo; en donde se induce de ese modo apoptosis en la célula cancerosa. El segundo agente activo puede ser etopósido, bortezomib, estaurosporina, doxorubicina, tamoxifeno, cisplatino, carboplatino, o paclitaxel. El segundo agente activo puede ser un agente activo mencionado posteriormente en este documento. El contacto puede ser *in vitro* o el contacto puede ser *in vivo*. La célula cancerosa puede ponerse en contacto con PAC-1 y el segundo agente activo al mismo tiempo. Alternativamente, la célula cancerosa se puede  
10 ponerse en contacto con PAC-1 antes de contactar la célula cancerosa con el segundo agente activo, o la célula cancerosa puede ponerse en contacto con PAC-1 después de contactar la célula cancerosa con el segundo agente activo.

15 La divulgación proporciona además un método para tratar un cáncer en un paciente que lo necesita, que comprende administrar a un paciente, simultánea o secuencialmente, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto PAC-1:



20 y una cantidad eficaz de un segundo agente activo; en donde de ese modo se trata el cáncer. El segundo agente activo puede ser etopósido, bortezomib, estaurosporina, doxorubicina, tamoxifeno, cisplatino, carboplatino, o paclitaxel. El segundo agente activo puede ser un agente activo mencionado posteriormente en este documento. El compuesto PAC-1 y el segundo agente activo pueden administrarse simultáneamente. Alternativamente, el compuesto PAC-1 y el segundo agente activo pueden administrarse secuencialmente. El compuesto PAC- puede administrarse  
25 antes del segundo agente activo. El compuesto PAC-1 puede administrarse después del segundo agente activo. El cáncer puede ser, por ejemplo, linfoma, osteosarcoma, cáncer de mama, cáncer de ovario u otro tipo de cáncer mencionado en este documento.

30 La divulgación proporciona así el uso de las composiciones descritas en este documento para uso en terapia médica. La terapia médica puede ser tratar cáncer, por ejemplo, linfoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de colon, y otros cánceres mencionados en este documento. La divulgación también proporciona el uso de una composición como se describe en este documento para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad en un mamífero, por ejemplo, cáncer en un humano. La divulgación proporciona así el uso de los compuestos descritos en este documento para la fabricación de medicamentos útiles  
35 para el tratamiento del cáncer en un mamífero, tal como un ser humano. El medicamento puede incluir un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

#### Breve descripción de los dibujos

40 Los siguientes dibujos forman parte de la memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertas realizaciones o diversos aspectos de la invención. En algunos casos, las realizaciones de la invención pueden entenderse mejor por referencia a los dibujos adjuntos en combinación con la descripción detallada presentada en este documento. La descripción y los dibujos adjuntos pueden resaltar un cierto ejemplo específico, o un cierto aspecto de la invención. Sin embargo, el experto en la materia comprenderá que partes del ejemplo o aspecto pueden usarse  
45 en combinación con otros ejemplos o aspectos de la invención.

**Figura 1.** Estructuras químicas de agentes quimioterapéuticos estructuralmente diversos: PAC-1, SPAC-1, etopósido, doxorubicina, bortezomib, estaurosporina, y tamoxifeno.

50 **Figura 2.** Efectos de PAC-1 con etopósido en muerte celular de U-937 (linfoma). Las líneas discontinuas representan el nivel de efectos puramente aditivos. La leyenda corresponde a las barras del gráfico de barras de la siguiente manera: barra izquierda = etopósido 0  $\mu\text{M}$ ; barra media = etopósido 2,5  $\mu\text{M}$ ; barra derecha = etopósido 5  $\mu\text{M}$ .

**Figura 3.** Efectos de PAC-1 con Velcade® (bortezomib) en muerte celular de U-937 (linfoma). No se observó muerte celular para bortezomib 0 nM a PAC-1 0 µM. La muerte celular se midió después de 6 horas en bortezomib. Las líneas discontinuas representan el nivel esperado de los efectos puramente aditivos; por tanto, la combinación muestra sinergia a concentraciones terapéuticamente pertinentes.

**Figura 4.** Efectos de PAC-1 con estaurosporina en muerte celular de U-937 (linfoma). Se observó poca o ninguna muerte celular para bortezomib 0 nM a PAC-1 0-15 µM. La muerte celular se midió después de 8 horas en estaurosporina. Las líneas discontinuas representan el nivel esperado de los efectos puramente aditivos; por tanto, la combinación muestra sinergia a concentraciones terapéuticamente pertinentes.

**Figuras 5.** PAC-1 muestra sinergia con doxorubicina para eliminar células de osteosarcoma 143B (OS humano). La leyenda corresponde a las barras del gráfico de barras donde la entrada de la leyenda superior corresponde a la barra de la izquierda, y las entradas de leyenda restantes corresponden a las barras restantes, de arriba a abajo correspondiendo de izquierda a derecha, respectivamente. No se observó muerte celular a Dox 0 nM con PAC-1 0 µM. Las líneas discontinuas representan el nivel de los efectos puramente aditivos; por tanto, la combinación muestra sinergia a concentraciones terapéuticamente pertinentes.

**Figura 6.** PAC-1 potencia el tamoxifeno en células BT20 (cáncer de mama triple negativo), evaluado a las 36 horas a diversas concentraciones de PAC-1 y tamoxifeno.

**Figura 7.** La combinación de PAC-1 y tamoxifeno es sinérgica para eliminar células BT20 (cáncer de mama triple negativo), evaluado a las 24 horas a diversas concentraciones de PAC-1 y tamoxifeno. Las leyendas corresponden a las barras del gráfico de barras donde la entrada de la leyenda superior corresponde a la barra de la izquierda, y las entradas de leyenda restantes corresponden a las barras restantes, de arriba a abajo correspondiendo de izquierda a derecha, respectivamente.

**Figura 8.** La combinación de PAC-1 y tamoxifeno es sinérgica para eliminar células MDA MB 436 (cáncer de mama triple negativo), evaluado a las 24 horas a diversas concentraciones de PAC-1 y tamoxifeno. Las leyendas corresponden a las barras del gráfico de barras donde la entrada de la leyenda superior corresponde a la barra de la izquierda, y las entradas de leyenda restantes corresponden a las barras restantes, de arriba a abajo correspondiendo de izquierda a derecha, respectivamente.

**Figura 9.** La combinación de PAC-1 y cisplatino es sinérgica para eliminar células IGROV-1 (carcinoma de ovario), evaluado a las 40 horas (tinción con anexina V/PI) a diversas concentraciones de PAC-1 y cisplatino. Las leyendas corresponden a las barras del gráfico de barras donde la entrada de la leyenda superior corresponde a la barra de la izquierda (ausente a cisplatino 0 µM), y las entradas de leyenda restantes corresponden a las barras restantes, de arriba a abajo correspondiendo de izquierda a derecha, respectivamente.

**Figura 10.** La combinación de PAC-1 y paclitaxel es sinérgica para eliminar células IGROV-1 (carcinoma de ovario), evaluado a las 40 horas (tinción con anexina V/PI) a diversas concentraciones de PAC-1 y paclitaxel. Las leyendas corresponden a las barras del gráfico de barras donde la entrada de la leyenda superior corresponde a la barra de la izquierda (ausente a 0 µM de paclitaxel), y las entradas de leyenda restantes corresponden a las barras restantes, de arriba a abajo correspondiendo de izquierda a derecha, respectivamente.

**Figura 11.** PAC-1 muestra sinergia con carboplatino para inducir muerte celular de HOS (osteosarcoma humano) en cultivo. Las células se trataron conjuntamente durante 8 horas, se reemplazó el medio y se permitió que las colonias crecieran durante 7 días.

**Figura 12.** PAC-1 muestra sinergia con carboplatino para inducir muerte celular de 143B (osteosarcoma humano) en cultivo. Las células se trataron conjuntamente durante 8 horas, se reemplazó el medio y se permitió que las colonias crecieran durante 7 días.

### Descripción detallada

Como introducción adicional, se han descubierto compuestos capaces de activar una enzima que a menudo se sobreexpresa o está presente a niveles elevados en su forma inactiva en las células cancerosas. Los compuestos pueden inducir muerte celular programada (apoptosis) en las células cancerosas, incluidos las que han regulado positivamente o aumentan los niveles de procaspasa-3. Muchos cánceres resisten la quimioterapia estándar. La terapia de combinación descrita en este documento aprovecha la activación de procaspasa-1 mediante PAC-1, que puede causar sinergia con las propiedades quimioterapéuticas de un segundo agente activo, para proporcionar eficacia en condiciones donde uno de los agentes activos por sí solo podría ser menos eficaz o completamente ineficaz. Estos compuestos también pueden tener éxito en terapia dirigida contra el cáncer, donde puede haber ventajas de selectividad en la destrucción de células cancerosas con reacciones adversas reducidas comparativamente a células no cancerosas que tienen niveles más bajos de procaspasa-3. Estas reacciones adversas pueden incluir toxicidad, particularmente neurotoxicidad.

La combinación de compuestos, composiciones y métodos descritos en este documento pueden actuar mediante modulación de apoptosis o muerte celular programada y otros mecanismos quimioterapéuticos que son eficaces en el tratamiento de células cancerosas. La modulación de apoptosis puede ser por inducción o activación de apoptosis. La administración de compuestos puede ser concurrente o, alternativamente, secuencial.

La divulgación proporciona por tanto métodos para la potenciación de un agente activo mediante PAC-1, por ejemplo, para el tratamiento del linfoma, osteosarcoma, o cáncer de mama. Durante la apoptosis, el zimógeno procaspasa-3 se activa mediante proteólisis a caspasa-3, y esta caspasa-3 activa escinde luego decenas de sustratos celulares, ejecutando el programa apoptótico. Debido a que los niveles de proteína procaspasa-3 son elevados en varias

histologías tumorales, la activación directa mediada por fármacos de procaspasa-3 puede ser altamente eficaz como estrategia selectiva anticancerígena.

5 Ciertos compuestos pueden mejorar la actividad y automaduración de la procaspasa-3 e inducir la apoptosis en las células cancerosas. El compuesto 1 activador de procaspasa (PAC-1, Figura 1) mejora la actividad de procaspasa-3 mediante la quelación de iones inhibidores de cinc, induce apoptosis en células cancerosas en cultivo, y tiene eficacia en múltiples modelos tumorales murinos. Se ha descubierto que las nuevas combinaciones de PAC-1 y varios agentes terapéuticos son sinérgicamente eficaces en el tratamiento de células cancerosas, particularmente linfoma, osteosarcoma, y células de cáncer de mama, como se describe en este documento. Debido a que PAC-1 actúa tarde  
10 en la cascada apoptótica, es excepcionalmente capaz de causar sinergia con una amplia gama de agentes quimioterapéuticos activos, como se describe a continuación.

### Definiciones

15 Como se usa en este documento, los términos enumerados tienen los siguientes significados. Todos los demás términos y expresiones utilizados en esta memoria descriptiva tienen sus significados habituales que entendería un experto en la materia. Tales significados habituales pueden obtenerse por referencia a diccionarios técnicos, tales como Hawley's Condensed Chemical Dictionary 14<sup>a</sup> edición, de R.J. Lewis, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 2001.

20 Las referencias en la memoria descriptiva a "una realización", "una realización", etc., indican que la realización descrita puede incluir un aspecto particular, rasgo, estructura, resto, o característica, pero no todas las realizaciones incluyen necesariamente ese aspecto, rasgo, estructura, resto, o característica. Además, tales expresiones pueden, pero no necesariamente, referirse a la misma realización a la que se hace referencia en otras partes de la memoria descriptiva.  
25 Además, cuando un aspecto particular, rasgo, estructura, resto, o característica se describe en relación con una realización, está dentro del conocimiento de un experto en la materia influir o conectar tal aspecto, rasgo, estructura, resto, o característico con otras realizaciones, se describa explícitamente o no.

30 Las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto estipule claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, una referencia a "un compuesto" incluye una pluralidad de tales compuestos, de modo que un compuesto X incluye una pluralidad de compuestos X. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Por tanto, esta declaración tiene la intención de servir como base antecedente para el uso de terminología exclusiva, tal como "solamente", "solo", y similares, en relación con la enumeración de elementos de reivindicación o el uso de una limitación "negativa".

35 El término "y/o" significa cualquiera de los elementos, cualquier combinación de los elementos, o todos los elementos con los que está asociado este término. La expresión "uno o más" se entiende fácilmente por el experto en la materia, particularmente cuando se lee en el contexto de su uso. Por ejemplo, uno o más sustituyentes en un anillo de fenilo se refiere a uno a cinco, o uno a cuatro, por ejemplo, si el anillo de fenilo está disustituido.

40 El término "aproximadamente" puede referirse a una variación de  $\pm 5\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 20\%$  o  $\pm 25\%$  del valor especificado. Por ejemplo, "aproximadamente 50" por ciento puede en algunas realizaciones suponer una variación de 45 a 55 por ciento. Para intervalos de enteros, el término "aproximadamente" puede incluir uno o dos enteros mayores y/o menores que un entero enumerado en cada extremo del intervalo. A menos que se indique lo contrario en este documento, el término "aproximadamente" pretende incluir valores, por ejemplo, porcentajes en peso, próximos al intervalo  
45 enumerado que son equivalentes en términos de funcionalidad del ingrediente individual, la composición, o la realización.

50 Como entenderá el experto, todos los números, incluyendo los que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, etc., son aproximaciones y se entiende que están modificados opcionalmente en todos los casos por el término "aproximadamente". Estos valores pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que buscan obtener los expertos en la materia utilizando las enseñanzas de las descripciones de este documento. También se entiende que tales valores contienen inherentemente una variabilidad resultante necesariamente de las desviaciones estándar encontradas en sus respectivas mediciones de ensayo.

55 Tal como entenderá el experto en la materia, para todos y cada uno de los fines, particularmente en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos mencionados en este documento también abarcan todos y cada uno de los posibles subintervalos y combinaciones de subintervalos de los mismos, así como los valores individuales que componen el intervalo, particularmente los valores enteros. Un intervalo enumerado (por ejemplo, porcentajes en peso o grupos de carbonos) incluye cada valor específico, entero, decimal, o identidad dentro del  
60 intervalo. Cualquier intervalo enumerado puede reconocerse fácilmente como lo suficientemente descriptivo y permite que el mismo intervalo se divida en al menos mitades iguales, tercios, cuartos, quintos, o décimos. Como ejemplo no limitante, cada intervalo discutido en este documento puede dividirse fácilmente en un tercio inferior, tercio medio y tercio superior, etc. Como también comprenderá un experto en la materia, todas las expresiones tales como "hasta",  
65 "al menos", "mayor que", "menos que", "más que", "o más", y similares, incluyen el número enumerado y tales términos se refieren a intervalos que pueden desglosarse posteriormente en subintervalos como se discutió anteriormente. Del

mismo modo, todas las proporciones que se mencionan en este documento también incluyen todas las subproporciones que se encuentran dentro de la proporción más amplia. Por tanto, los valores específicos enumerados para radicales, sustituyentes e intervalos, son solo para ilustración; no excluyen otros valores definidos u otros valores dentro de intervalos definidos para radicales y sustituyentes.

5 Un experto en la materia también reconocerá fácilmente que cuando los miembros se agrupan de manera común, tal como en un grupo de Markush, la divulgación incluye no solo a todo el grupo enumerado como un todo, sino cada miembro del grupo individualmente y todos los subgrupos posibles del grupo principal. Además, para todos los fines, la divulgación incluye no solo al grupo principal, sino también el grupo principal ausente uno o más de los miembros del grupo. Por tanto, la divulgación contempla la exclusión explícita de uno o más de los miembros de un grupo enumerado. Por tanto, pueden aplicarse condiciones a cualquiera de las categorías o realizaciones divulgadas mediante las cuales uno o más de los elementos enumerados, especies, o realizaciones, pueden excluirse de tales categorías o realizaciones, por ejemplo, como se usa en una limitación negativa explícita.

15 El término "poner en contacto" se refiere al acto de tocar, haciendo contacto o acercándose a una proximidad inmediata o cercana, incluso a nivel celular o molecular, por ejemplo, para provocar una reacción fisiológica, una reacción química, o un cambio físico, por ejemplo, en una solución, en una mezcla de reacción, *in vitro* o *in vivo*.

20 "Simultáneamente" significa (1) simultáneamente en el tiempo, o (2) en diferentes momentos durante el curso de un programa de tratamiento común.

"Secuencialmente" se refiere a la administración de un agente activo usado en el método seguido de administración de otro agente activo. Después de la administración de un agente activo, el siguiente agente activo puede administrarse sustancialmente inmediatamente después del primero, o el siguiente agente activo puede administrarse después de un período de tiempo eficaz después del primer agente activo; el período de tiempo eficaz es la cantidad de tiempo otorgado para obtener el máximo beneficio desde la administración del primer agente activo.

30 Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para tratar una enfermedad, trastorno y/o afección, o para provocar un efecto enumerado, tal como activación o inhibición. Por ejemplo, una cantidad eficaz puede ser una cantidad eficaz para reducir la progresión o gravedad de la afección o los síntomas que se están tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de las capacidades de los expertos en la materia. La expresión "cantidad eficaz" pretende incluir una cantidad de un compuesto descrito en este documento, o una cantidad de una combinación de compuestos descritos en este documento, por ejemplo, que es eficaz para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno, o para tratar los síntomas de la enfermedad o trastorno, en un hospedador. Por tanto, una "cantidad eficaz" generalmente significa una cantidad que proporciona el efecto deseado. En una realización, una cantidad eficaz se refiere a una cantidad del agente activo descrito en este documento que es eficaz, solo o en combinación con un vehículo farmacéutico, tras la administración de dosis únicas o múltiples a una célula o sujeto, por ejemplo, un paciente, en inhibir el crecimiento o proliferación, inducir la eliminación, o prevenir el crecimiento de células hiperproliferativas. Tal inhibición o muerte del crecimiento puede reflejarse como una prolongación de la supervivencia del sujeto, por ejemplo, un paciente más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento, o cualquier mejora en el pronóstico del sujeto en relación con la ausencia de dicho tratamiento.

45 Los términos "tratando", "tratar" y "tratamiento" incluyen (i) prevenir una enfermedad, patología o afección médica (por ejemplo, profilaxis); (ii) inhibir la enfermedad, patología o afección médica o detener su desarrollo; (iii) aliviar la enfermedad, patología o afección médica; y/o (iv) disminuir los síntomas asociados con la enfermedad, patología o afección médica. Por tanto, los términos "tratar", "tratamiento", y "tratando" pueden extenderse a la profilaxis y pueden incluir prevenir, prevención, prevenir, disminuir, detener o revertir la progresión o la gravedad de la afección o los síntomas que se están tratando. Por tanto, el término "tratamiento" puede incluir administración médica, terapéutica y/o profiláctica, según sea apropiado. En algunas realizaciones, los términos "tratamiento", "tratar" o "tratando" puede referirse a (i) prevención del crecimiento tumoral o la recidiva del tumor (profilaxis), (ii) una reducción o eliminación de síntomas o la enfermedad de interés (terapia) o (iii) la eliminación o destrucción del tumor (cura).

55 Los términos "inhibir", "inhibiendo", e "inhibición" se refieren a la ralentización, detención como reversión del crecimiento o progresión de una enfermedad, infección, afección, o grupo de células. La inhibición puede ser mayor de aproximadamente 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 99 %, por ejemplo, en comparación con el crecimiento o progresión que se produce en ausencia del tratamiento o contacto. Además, los términos "inducir" "inhibir", "potenciar", "elevar", "aumentar", "disminuir", o similares indican diferencias cuantitativas entre dos estados, y pueden referirse al menos a diferencias estadísticamente significativas entre los dos estados. Por ejemplo, "una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de células hiperproliferativas" significa que la tasa de crecimiento de las células puede ser, en algunas realizaciones, al menos estadísticamente significativamente diferente de las células no tratadas. Dichos términos pueden aplicarse en este documento a, por ejemplo, tasas de proliferación.

65 La expresión "inhibir el crecimiento o proliferación" de la célula hiperproliferativa, por ejemplo, células neoplásicas, se refiere a la ralentización, interrupción, detención, o parada de su crecimiento y metástasis, y no indica necesariamente una eliminación total del crecimiento neoplásico.

El término "cáncer" generalmente se refiere a cualquiera de un grupo de más de 100 enfermedades causadas por el crecimiento descontrolado de células anormales. El cáncer puede tomar la forma de tumores sólidos y linfomas, y cánceres no sólidos tales como leucemia. A diferencia de las células normales, que se reproducen hasta la maduración y luego solo según sea necesario para reemplazar las células heridas, las células cancerosas pueden crecer y dividirse sin cesar, desplazando a las células cercanas y finalmente extendiéndose a otras partes del cuerpo.

La divulgación proporciona métodos para tratar cáncer y afecciones cancerosas. La expresión "afección cancerosa" se refiere a cualquier condición en donde las células están en un estado anormal o condición que se caracteriza por una rápida proliferación o neoplasia. Una afección cancerosa puede ser de naturaleza maligna o no maligna (por ejemplo, condición precancerosa). Para describir más a fondo una "condición cancerosa", los términos "hiperproliferativo", "hiperplásico", "hiperplasia", "maligno", "neoplásico" y "neoplasia", pueden usarse. Estos términos pueden usarse indistintamente y están destinados a incluir todos los tipos de crecimiento hiperproliferativo, crecimiento hiperplásico, crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células malformadas, tejidos u órganos, independientemente del tipo histopatológico, etapa de invasividad o determinación cancerosa (por ejemplo, maligna y no maligna).

El término "neoplasia" se refiere al crecimiento de nuevas células que resulta en una pérdida de la capacidad de respuesta a los controles normales de crecimiento, por ejemplo, crecimiento celular neoplásico. Una "hiperplasia" se refiere a células que sufren una velocidad de crecimiento anormalmente elevada. Sin embargo, estos términos pueden usarse indistintamente, como revelará el contexto, haciendo referencia generalmente a células que sufren velocidades de crecimiento celular anormales. "Neoplasias" e "hiperplasias" incluyen tumores, que pueden ser benignos, premalignos, carcinoma *in situ*, malignos, sólidos o no sólidos. Ejemplos de algunas afecciones cancerosas que están dentro del alcance de la invención incluyen, pero sin limitación, cáncer de ano, cáncer de vejiga de células transicionales, cáncer de huesos, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, sarcoma de Kaposi, leucemia, cáncer de pulmón tal como cáncer de pulmón broncogénico, cáncer de pulmón microcítico y cáncer de pulmón no microcítico, Linfoma de Hodgkin, Linfoma no Hodgkin, linfoma maligno, neuroblastomas, carcinomas osteogénicos (por ejemplo, cáncer de hueso), cánceres oftálmicos (por ejemplo, retinoblastomas y otros cánceres de ojo), cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer renal, cánceres de piel tales como melanoma, sarcomas de tejidos blandos, cáncer de tiroides, y tumor de Wilms. Otros ejemplos de afecciones hiperproliferativas no malignas (por ejemplo, afecciones precancerosas) que están dentro del alcance de la invención incluyen, pero sin limitación, adenomas, condromas, encondromas, fibromas, miomas, mixomas, neurinomas, osteoblastomas, osteocondromas, osteomas, tumores papilares, y similares.

Los términos "leucemia" o "cáncer leucémico" se refieren a todos los cánceres o neoplasias del sistema hematopoyético e inmune (sistema sanguíneo y linfático). Estos términos se refieren a una enfermedad progresiva maligna de órganos formadores de sangre, marcada por proliferación distorsionada y desarrollo de leucocitos y sus precursores en la sangre y la médula ósea. Los mielomas se refieren a otros tipos de tumores de células sanguíneas y médula ósea. Los linfomas se refieren a tumores del tejido linfático. Ejemplos de leucemia incluyen leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (LLA), y leucemia mielógena crónica (CML).

Como se describe en este documento, las composiciones y métodos pueden usarse para el tratamiento o prevención de diversos trastornos neoplásicos incluyendo afecciones tales como melanoma lentiginoso acral, queratosis actínicas, adenocarcinoma, carcinoma adenoide quístico, adenomas, adenosarcoma, carcinoma adenoescamoso, tumores astrocíticos, carcinoma de glándula de Bartholin, carcinoma de células basales, carcinomas de glándula bronquial, capilar, carcinoides, carcinoma, carcinosarcoma, cavernoso, colangiocarcinoma, condrosarcoma, papiloma/carcinoma de plexo corioides, carcinoma de células claras, quistadenoma, tumor del seno endodérmico, hiperplasia endometrial, sarcoma del estroma endometrial, adenocarcinoma endometriode, ependimaria, epiteliode, sarcoma de Ewing, fibrolamelares, hiperplasia nodular focal, gastrinoma, tumores de células germinales, glioblastoma, glucagonoma, hemangioblastomas, hemangioendotelioma, hemangiomas, adenoma hepático, adenomatosis hepática, carcinoma hepatocelular, insulinooma, neoplasia intaepitelial, neoplasia de células escamosas interepiteliales, carcinoma de células escamosas invasivas, carcinoma macrocítico, leiomiomas, melanomas lentigo maligno, melanoma maligno, tumores mesoteliales malignos, meduloblastoma, meduloepitelioma, melanoma, meníngeo, mesotelial, carcinoma metastásico, carcinoma mucoepidermoide, neuroblastoma, adenocarcinoma neuroepitelial melanoma nodular, carcinoma de células en avena, oligodendroglioma, osteosarcoma, polipéptido pancreático, adenocarcinoma seroso papilar, célula pineal, tumores de la pituitaria, plasmacitoma, pseudosarcoma, blastoma pulmonar, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabiomiosarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, carcinoma microcítico, carcinomas de tejidos blandos, tumor secretor de somatostatina, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas submesotelial, melanoma de diseminación superficial, carcinoma indiferenciado, melanoma maligno uveal, carcinoma verrugoso, vipoma, carcinoma bien diferenciado, y tumor de Wilm. Por tanto, las composiciones y métodos descritos en este documento pueden usarse para tratar cáncer de vejiga, cáncer de cerebro (incluyendo neoplasias intracraneales tales como glioma, meningioma, neurinoma, y adenoma), cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón (SCLC o NSCLC), cáncer de ovario, cáncer pancreático y cáncer de próstata.

En algunas realizaciones, la combinación de PAC-1 y un segundo agente activo (por ejemplo, un agente quimioterapéutico mencionado en este documento) puede ser particularmente eficaz para tratar cánceres de cerebro. Los cánceres de cerebro incluyen, pero sin limitación, oligodendrogliomas y glioblastomas, incluyendo glioblastoma

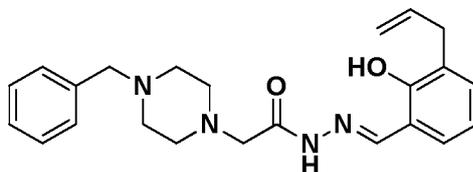
multiforme (GBM). Los tejidos afectados por células cancerosas pueden estar en el propio cerebro (por ejemplo, cráneo o canal espinal central) o en el tejido linfático, en vasos sanguíneos, en los nervios craneales, en las envolturas cerebrales (meninges), cráneo, glándula pituitaria, o glándula pineal. Las formas específicas de cáncer cerebral que pueden tratarse incluyen astrocitomas, condromas, condrosarcomas, cordomas, linfomas del SNC (sistema nervioso central), craneofaringiomas, ependimomas, gangliogliomas, ganglioneuromas (también llamados gangliocitomas), gliomas, incluyendo astrocitomas, oligodendrogliomas, y ependimomas, hemangioblastomas (también llamados tumores vasculares), tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET) tales como meduloblastomas, meningiomas y schwannomas vestibulares (anteriormente conocidos como neuroma acústico/schwannoma).

10 La combinación también puede usarse para tratar tumores metastásicos que invaden la esfera intracraneal de cánceres que se originan en otros órganos del cuerpo. Estas afecciones generalmente se denominan tumores cerebrales secundarios. Los tumores cerebrales secundarios que pueden tratarse con la combinación de PAC-1 y un segundo agente activo incluyen tumores metastásicos del cerebro que se originan a partir de cáncer de pulmón, cáncer de mama, melanoma maligno, cáncer de riñón, cáncer de colon, y otros carcinomas.

15 Otros ejemplos de afecciones cancerosas que están dentro del alcance de la invención incluyen, pero sin limitación, neuroblastomas y carcinomas osteogénicos (por ejemplo, cáncer óseo o crecimiento neoplásico de tejido óseo). Ejemplos de tumores óseos primarios malignos que pueden tratarse con la combinación de PAC-1 y un segundo agente activo incluyen osteosarcomas, condrosarcomas, sarcoma de Ewing, fibrosarcomas, y similares, y tumores óseos secundarios tales como lesiones metastásicas que se han diseminado desde otros órganos, incluyendo carcinomas de mama, pulmón, y próstata.

#### Agentes terapéuticos y actividad

25 El compuesto 1 activador de procaspasa-1 (PAC-1; (2-(4-bencilpiperazin-1-il)-N-[(2-hidroxi-3-prop-2-enilfenil)metilidenoamino]acetamida) induce selectivamente la apoptosis en las células cancerosas. La estructura de PAC-1 se muestra en la **Figura 1** y los métodos de preparación de PAC-1 se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2012/0040995 (Hergenrother *et al.*).



**PAC-1**

30 PAC-1 aumenta la actividad de procaspasa-3 mediante la quelación de iones inhibidores de cinc, induce apoptosis en células cancerosas. PAC-1 puede mejorar la actividad y automaduración de procaspasa-3 e inducir la apoptosis en células cancerosas. PAC-1 también mejoró la actividad quimioterapéutica de varios otros fármacos, a menudo cuando PAC-1 o el segundo activo es menos eficaz o completamente inactivo solo. Por tanto, sorprendentemente se descubrió que PAC-1 causa sinergia con la actividad de numerosas clases de agentes quimioterapéuticos. Ejemplos de clases de compuestos que pueden causar sinergia con PAC-1 incluyen:

- (a) inhibidores/moduladores de la familia bcl-2 (incluyendo inhibidores de bax y bcl-xl);
- (b) moduladores de proteínas que contienen el motivo BIR (por ejemplo, survivina, miméticos de SMAC y similares);
- (c) moduladores/estabilizadores o inhibidores de microtúbulos o elementos del citoesqueleto (por ejemplo, taxanos tales como paclitaxel y docetaxel);
- (d) agentes alquilantes tales como ciclofosfamida, DTIC o antibióticos citotóxicos tales como doxorubicina;
- (e) agentes de intercalación de ADN (por ejemplo, platinos tales como cisplatino, carboplatino u oxaliplatino);
- (f) agentes moduladores de autofagia tales como temozolomida;
- (g) inhibidores de transducción de señales de células tumorales (por ejemplo, inhibidores o EGFR de tipo natural o mutante, braf, Ras, AKT, cMET, mTOR, PI3K, BTK, miembros de la familia JAK/STAT, MEK);
- (h) inhibidores/moduladores de receptores de señalización (por ejemplo, tamoxifeno, anticuerpos contra EGFR, CD20, CD19 y otros sobreexpresados o expresados rutinariamente en células tumorales);
- (i) inhibidores/moduladores de angiogénesis (por ejemplo, VEGF, VEGFR, angiogeninas, angiostatinas, proteínas TIE, endostatinas, y similares);
- (j) moduladores del mecanismo inmunitario (por ejemplo, vacunas, terapias celulares, inhibidores del punto de control, citocinas/anticuerpos proinflamatorios, adyuvantes, y similares); y
- (k) inhibidores del proteasoma tales como bortezomib.

55 Ejemplos de agentes quimioterapéuticos específicos (agentes activos o "segundos agentes activos") y que pueden combinarse ventajosamente con PAC-1 incluyen agentes activos tales como, cisplatino, etopósido, irinotecán,

camptostar, topotecán, paclitaxel, docetaxel, epotilonas, taxotere, tamoxifeno, 5-fluorouracilo, metotrexato, temozolomida, ciclofosfamida, SCH 66336, R115777, L778.123, BMS 214662, gefitinib, clorhidrato de erlotinib, anticuerpos contra EGFR, imatinib, intrón, ara-C, citoxano, gemcitabina, mostaza de uracilo, clormetina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, pipobromano, trietilenmelamina, trietilenotiofosforamina, busulfán, carmustina, lomustina, estreptozocina, dacarbazina, floxuridina, citarabina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fosfato de fludarabina, pentostatina, vinblastina idarrubicina, vincristina, vindesina, bleomicina, doxorubicina, dactinomicina, daunorrubicina, epirubicina, , mitramicina, desoxicoformicina, L-asparaginasa, tenipósido, etinilestradiol, dietilestilbestrol, testosterona, prednisona, fluoximasterona, propionato de dromostanolona, testolactona, acetato de megestrol, metilprednisolona, metiltestosterona, prednisolona, triamcinolona, clortrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutetimida, estramustina, acetato de medroxiprogesterona, leuprolida, flutamida, toremifeno, Goserelina, hidroxiiurea, amsacrina, procarbazona, mitotano, mitoxantrona, levamisol, navelbeno, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, droloxafina, hexametilmelamina, bevacizumab, herceptin, Bexxar, Zevalin, Trisenox, Xeloda, Vinorelbina, Porfimer, cetuximab, Tiotepa, Altretamina, Melfalán, Trastuzumab, Lerazol, Fulvestrant, Exemestano, Fulvestrant, Ifosfomida, Rituximab, C225, Campath, carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, busulfán, nitrosurea, plicomicina, mitomicina, raloxifeno, agentes de unión a receptor de estrógeno, navelbina, inhibidores de la farnesil-proteína transferasa, transplatino y metotrexato, o cualquier variante análoga o derivada de lo anterior.

Ejemplos de agente activo quimioterapéutico que muestran actividad significativa cuando se combina con PAC-1 o un derivado de PAC-1 incluyen etopósido, bortezomib, estaurosporina, doxorubicina, tamoxifeno, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, y mimético de SMAC.

**Combinación con etopósido (no según la invención)**

El etopósido es un inhibidor de la topoisomerasa II. El etopósido forma un complejo ternario con ADN y la enzima topoisomerasa II, previniendo la religadura de las cadenas de ADN, que causa errores en la síntesis de ADN y promueve la apoptosis de la célula cancerosa. El tratamiento combinado de las células U-937 con PAC-1 y etopósido mostró actividad *in vitro* significativa incluso a bajas concentraciones micromolares (**Figura 2**).

**Combinación con bortezomib**

Velcade® (bortezomib) se une al sitio catalítico del proteasoma 26S con alta afinidad y especificidad. En células normales, el proteasoma regula la expresión y función de las proteínas mediante la degradación de las proteínas ubiquitiniladas, y también limpia la célula de proteínas anormales o mal plegadas. Si bien es probable que intervengan múltiples mecanismos, la inhibición del proteasoma puede prevenir la degradación de factores proapoptóticos, permitiendo la activación de la muerte celular programada en células neoplásicas que dependen de la supresión de las vías proapoptóticas. Se observó actividad sinérgica para el tratamiento combinado de células de linfoma U-937 con PAC-1 y bortezomib (**Figura 3**).

**Combinación con estaurosporina**

La principal actividad biológica de la estaurosporina es la inhibición de la proteína quinasa a través de la prevención de la unión del ATP a la quinasa, que se logra a través de la afinidad más fuerte de estaurosporina al sitio de unión a ATP en la quinasa. La estaurosporina es un inhibidor prototípico de quinasa competitivo por ATP, ya que se une a muchas quinasas con alta afinidad, aunque con baja selectividad. La falta de especificidad ha impedido su uso clínico, pero lo ha convertido en una valiosa herramienta de investigación donde la estaurosporina se usa para inducir apoptosis. Una forma en que la estaurosporina induce la apoptosis es activando la caspasa-3. El tratamiento combinado de las células de linfoma U-937 con PAC-1 y estaurosporina mostró efectos sinérgicos a bajas concentraciones de PAC-1, tal como PAC-1 7,5 µM y 15 µM (**Figura 4**).

**Combinación con doxorubicina**

La doxorubicina es un antibiótico de antraciclina que ejerce su actividad citotóxica por intercalación de ADN. La doxorubicina se usa para tratar una amplia gama de cánceres, incluyendo neoplasias hematológicas, muchos tipos de carcinoma y sarcomas y osteosarcomas de tejidos blandos. Se observó actividad sinérgica para el tratamiento combinado de células de osteosarcomas 143B (OS humano) con PAC-1 y doxorubicina (**Figura 5**).

**Combinación con tamoxifeno**

El tamoxifeno, un agonista competitivo de receptores de estrógenos es el tratamiento más común para cáncer de mama masculino y se usa para los cánceres de mama ER+ tempranos y avanzados. El tamoxifeno está aprobado para prevención del cáncer de mama en personas de alto riesgo. La combinación de tamoxifeno y PAC-1 es sinérgica y proporciona una mayor eficacia de eliminación celular en cáncer de mama, incluyendo cáncer de mama tamoxifeno negativo o resistente al tamoxifeno y cáncer de mama triple negativo (**Figuras 6-8**).

**Combinación con cisplatino (no según la invención)**

El cisplatino es uno de diversos complejos de coordinación de platino que se usan en la quimioterapia contra el cáncer. La citotoxicidad de los compuestos de platino puede ser resultado de la inhibición de la síntesis de ADN en las células cancerosas. El cisplatino se usa para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluyendo sarcomas, carcinomas (incluyendo cáncer de pulmón microcítico y cáncer de ovario), linfomas, tumores de células germinales y cáncer testicular. La combinación de cisplatino y PAC-1 puede ser sinérgica y puede proporcionar una mayor eficacia de eliminación celular en estos tratamientos, así como en carcinoma de ovario (**Figura 9**).

**Combinación con paclitaxel**

El paclitaxel, un inhibidor mitótico (estabilizador de microtúbulos), se usa en el tratamiento de cáncer de pulmón, ovario, mama y cabeza y cuello. El paclitaxel se recomienda para el tratamiento de cáncer de mama avanzado después del fracaso de las antociclinas y se recomienda su uso en cáncer de mama temprano con ganglios positivos. La combinación de paclitaxel y PAC-1 proporciona actividad sinérgica y mejores eficacia de eliminación celular en estos tratamientos, así como en carcinoma de ovario (**Figura 10**).

**Combinación con carboplatino**

El carboplatino es otro de los diversos complejos de coordinación de platino que se usan en quimioterapia contra el cáncer. El carboplatino se usa para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, principalmente carcinoma de ovario, pulmón, cánceres de cabeza y cuello. La combinación de carboplatino y PAC-1 es sinérgica y puede proporcionar una mayor eficacia de eliminación celular en estos tratamientos, así como en osteosarcoma (**Figuras 11 y 12**).

**Estudios de combinación adicionales (no según la invención)**

Utilizando líneas celulares que representan 12 de los 17 subtipos de cáncer de seno recientemente definidos (**Tabla 1**), el examen de las dosis no letales de sensibilización/sinergia de PAC-1 con medicamentos de atención estándar está en marcha.

**Tabla 1.** Líneas celulares de cáncer de mama bajo investigación.

Subgrupo	Línea celular
5	BT20
5	BT549
5	Hs578T
2	HCC1569
4	MCF7
4	T47D
6	MDAMB361
7	AU565
8	HCC1954
9	MDAMB231
10	HCC202
14	MDAMB436
16	BT483

El PAC-1 combinado con una diversidad de agentes de atención estándar diferentes también puede proporcionar actividad aditiva o sinérgica que de otro modo no se podría obtener. Ejemplos de tales agentes de atención estándar que se investigan para efectos combinados incluyen:

Lapatinib, un inhibidor doble de tirosina quinasa (EGFR y HER2) se usa en terapia para los cánceres HER2 positivos y en terapia de primera línea para cánceres de mama triple positivos. La combinación de lapatinib y PAC-1 puede proporcionar una mayor eficacia de eliminación celular en estos tratamientos.

El fluorouracilo (5-FU) es un medicamento análogo a la pirimidina que se usa en el tratamiento de una diversidad de cánceres. Es un inhibidor suicida y funciona por inhibición irreversible de la timidilato sintasa. La combinación de 5-FU y PAC-1 puede proporcionar eficacia de eliminación celular mejoradas en cánceres tratables con 5-FU.

En diversas realizaciones, PAC-1 puede intercambiarse con su SPAC-1 análogo para actividad mejorada similar, aditiva o sinérgica. Los efectos combinados de SPAC-1 con terapias oncológicas comunes contra líneas celulares de cáncer de colon, pulmón e hígado se están investigando. Ejemplos de los agentes combinados, líneas celulares y datos que se pueden obtener se resumen en la Tabla 2 y la Tabla 3, donde, por ejemplo, PAC-1 o SPAC-1 pueden combinarse con cualquiera de los Agentes estándar 1-4.

**Tabla 2.** Líneas celulares y agentes para efectos de combinación.

Línea celular	Tejido	Agente estándar 1	Agente estándar 2	Agente estándar 3	Agente estándar 4
DLD-1 (BIRC5 <sup>+</sup> )	Colon	SN-38	Oxaliplatino		

<b>HCT-116</b>	Colon	SN-38	Oxaliplatino		
<b>Hep3B</b>	Hígado	Sorafenib	Sunitinib		
<b>HepG2</b>	Hígado	Sorafenib	Sunitinib		
<b>A549 (NSCL-AC)</b>	Pulmón	Oxaliplatino	Gemcitabina	Erlotinib	Pemetrexed
<b>H292 (NSCL-C)</b>	Pulmón	Oxaliplatino	Gemcitabina	Erlotinib	Pemetrexed
<b>SK-MES-1 (SCC)</b>	Pulmón	Oxaliplatino	Etopósido	Gemcitabina	

**Tabla 3.** Datos en investigación para experimentos de efectos de combinación, donde Fármaco 1 es PAC-1 o un derivado del mismo y Fármaco 2 es un agente activo mencionado o descrito en este documento.

		Fármaco 1					
		0	0,25X (Cl <sub>50</sub> )	0,5X (Cl <sub>50</sub> )	1,0X (Cl <sub>50</sub> )	2,0X (Cl <sub>50</sub> )	4X (Cl <sub>50</sub> )
Fármaco 2	0	Control	(F <sub>a</sub> ) <sub>1</sub>				
	0,25X (Cl <sub>50</sub> )	(F <sub>a</sub> ) <sub>2</sub>	(F <sub>a</sub> ) <sub>1,2</sub>				
	0,5X (Cl <sub>50</sub> )	(F <sub>a</sub> ) <sub>2</sub>		(F <sub>a</sub> ) <sub>1,2</sub>			
	1,0X (Cl <sub>50</sub> )	(F <sub>a</sub> ) <sub>2</sub>			(F <sub>a</sub> ) <sub>1,2</sub>		
	2,0X (Cl <sub>50</sub> )	(F <sub>a</sub> ) <sub>2</sub>				(F <sub>a</sub> ) <sub>1,2</sub>	
	4X (Cl <sub>50</sub> )	(F <sub>a</sub> ) <sub>2</sub>					(F <sub>a</sub> ) <sub>1,2</sub>

**F<sub>a</sub> = Fracción celular afectada por el tratamiento**

5 Los agentes activos que pueden combinarse con PAC-1 o un derivado del mismo para proporcionar una actividad mejorada o sinérgica para inhibir el crecimiento de células cancerosas o para tratar un tipo particular de cáncer incluyen además:

10 SN-38 es el metabolito activo de irinotecán (un análogo de camptotecina, un inhibidor de topoisomerasa I). SN-38 es 200 veces más activo que el propio irinotecán. El uso principal de irinotecán es en cáncer de colon, en particular, en combinación con otros agentes de quimioterapia. La combinación de SN-38 y PAC-1 puede proporcionar eficacia de eliminación celular mejoradas en estos tratamientos.

15 El oxaliplatino es uno de varios complejos de coordinación de platino que se usan en quimioterapia contra el cáncer. Se cree que la citotoxicidad de los compuestos de platino es resultado de la inhibición de la síntesis de ADN en células cancerosas. Los estudios *in vivo* mostraron que el oxaliplatino tiene actividad antitumoral contra el carcinoma de colon a través de sus efectos citotóxicos (no dirigidos). La combinación de oxaliplatino y PAC-1 puede proporcionar una mayor eficacia de eliminación celular en estos tratamientos.

20 Sorafenib es un inhibidor molecular pequeño de varias proteínas tirosina quinasas (VEGFR y PDGFR) y Raf. Sorafenib se dirige a la vía quinasa MAP (vía Raf/Mek/Erk) (vía quinasa MAP) y está aprobado para tratamiento del cáncer primario de riñón (carcinoma avanzado de células renales) y el cáncer primario avanzado de hígado (carcinoma hepatocelular). La combinación de sorafenib y PAC-1 puede proporcionar mayor eficacia de eliminación celular en estos tratamientos.

25 Sunitinib es un inhibidor oral, de molécula pequeña, de tirosina quinasa receptora (RTK) multidireccional que fue aprobado por la FDA para el tratamiento de carcinoma de células renales (RCC) y tumor del estroma gastrointestinal (GIST) resistente a imatinib. La combinación de sunitinib y PAC-1 puede proporcionar una mayor eficacia de eliminación celular en estos tratamientos.

30 La gemcitabina es un análogo de nucleósido utilizado para quimioterapia. Al igual que el fluorouracilo y otros análogos de pirimidina, el análogo de trifosfato de gemcitabina reemplaza uno de los componentes básicos de los ácidos nucleicos, en este caso la citidina, durante la replicación del ADN. El proceso detiene el crecimiento tumoral, ya que solo puede unirse un nucleósido adicional al nucleósido "defectuoso", resultando en apoptosis. Otro objetivo de la gemcitabina es la enzima ribonucleótido reductasa (RNR). El análogo de difosfato se une al sitio activo de RNR e inactiva la enzima de manera irreversible. Una vez se inhibe RNR, la célula no puede producir los desoxirribonucleótidos necesarios para la replicación y reparación del ADN, y se induce apoptosis celular. La combinación de gemcitabina y PAC-1 puede proporcionar una mayor eficacia de eliminación celular en estos tratamientos.

40 Erlotinib es un medicamento utilizado para tratar cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de páncreas y diversos otros tipos de cáncer. Es un inhibidor de tirosina quinasa, que actúa sobre el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La combinación de erlotinib y PAC-1 puede proporcionar una mayor eficacia de eliminación celular en estos tratamientos.

45 Pemetrexed es un medicamento de quimioterapia utilizado en el tratamiento del mesotelioma pleural, así como en cáncer de pulmón no microcítico. Pemetrexed pertenece a la clase de medicamentos de quimioterapia llamados

antimetabolitos de folato. Funciona al inhibir tres enzimas utilizadas en la síntesis de purina y pirimidina: timidilato sintasa (TS), dihidrofolato reductasa (DHFR) y glicinamida ribonucleótido formiltransferasa (GARFT). Al inhibir la formación de precursores de nucleótidos purina y pirimidina, pemetrexed previene la formación de ADN y ARN, que son necesarios para el crecimiento y la supervivencia de células normales y células cancerosas. La combinación de pemetrexed y PAC-1 puede proporcionar una mayor eficacia de eliminación celular en estos tratamientos.

Si bien hay un claro beneficio para las estrategias contra el cáncer que utilizan combinaciones de medicamentos que actúan sobre diferentes objetivos, el trabajo descrito en este documento demuestra que se puede observar una sinergia drástica con compuestos que actúan a través de mecanismos dispares. Este enfoque de múltiples objetivos puede tener ventajas particulares cuando se busca la activación de una enzima.

PAC-1 es seguro en mamíferos, y un derivado de PAC-1 fue eficaz en un ensayo clínico de fase I de perros con linfoma (Peterson *et al.*, Cancer Res 70, 7232-7241 (2010)), por tanto, la sinergia observada con agentes activos tales como etopósido, bortezomib, estaurisporina, doxorubicina y tamoxifeno tendrá un impacto clínico significativo. El interés en activar enzimas con moléculas pequeñas está aumentando rápidamente. Los datos descritos en este documento indican que las estrategias de focalización que utilizan PAC-1 y dichos agentes activos complementarios es un enfoque general para la mejora drástica del efecto biológico deseado y deberían tener un impacto clínico considerable debido a su eficacia.

## Métodos de la divulgación

La divulgación proporciona métodos para inducir selectivamente apoptosis en una célula cancerosa, que comprenden administrar a una célula cancerosa una combinación de compuestos capaces de modificar una molécula de procaspasa-3 de dicha célula cancerosa; en donde la combinación de compuestos es PAC-1 y un segundo agente activo. También se describe un método para inducir selectivamente apoptosis en una célula cancerosa, que comprende administrar a una célula cancerosa una combinación de compuestos capaces de modificar una molécula de procaspasa-3 de la célula cancerosa; en donde la combinación de compuestos es PAC-1 y un segundo agente activo, por ejemplo, en donde la célula cancerosa se encuentra en un paciente que necesita tratamiento.

La divulgación proporciona métodos adicionales donde la combinación de compuestos mencionada es PAC-1 y un segundo agente activo, por ejemplo, como método para tratar una célula cancerosa, que comprende (a) identificar una posible susceptibilidad al tratamiento de una célula cancerosa con un compuesto activador de procaspasa; y (b) exponer la célula cancerosa a una cantidad eficaz de una combinación de un compuesto activador de procaspasa y un segundo agente activo. También se proporciona un método para tratar una célula cancerosa, que comprende (a) identificar una posible susceptibilidad al tratamiento de una célula cancerosa con un compuesto activador de procaspasa; y (b) exponer dicha célula cancerosa a una cantidad eficaz de PAC-1 y un segundo agente activo; en donde el PAC-1 es capaz de activar al menos una de procaspasa-3 y procaspasa-7. También se proporciona un método para inducir la muerte en una célula cancerosa (por ejemplo, eliminar una célula cancerosa), que comprende administrar a una célula cancerosa un agente activo y un compuesto capaz de activar una molécula de procaspasa-3 de la célula cancerosa, tal como PAC-1.

La divulgación proporciona además un medicamento que comprende una cantidad eficaz de la combinación de PAC-1 y un segundo agente activo. El medicamento puede usarse en un método para inducir apoptosis en una célula. La combinación de compuestos no atraviesa la barrera hematoencefálica en la medida en que cause efectos neurotóxicos apreciables en un paciente. Los métodos de la divulgación incluyen poner en contacto una o más células con una cantidad eficaz de una combinación de compuestos descritos en este documento, *in vivo* o *in vitro*. Por tanto, la divulgación también proporciona métodos para tratar una célula que incluyen poner en contacto una célula con una cantidad eficaz de una combinación de compuestos descritos en este documento.

Como se describe en este documento, la descripción proporciona métodos para tratar a un paciente que tiene células tumorales que tienen niveles elevados de procaspasa-3. Los métodos pueden incluir administrar a un paciente que tiene células tumorales con niveles elevados de procaspasa-3 una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de PAC-1 y un segundo agente activo descrito en este documento, o una composición de los mismos. La divulgación proporciona además métodos para tratar una célula tumoral que tiene un nivel elevado de procaspasa-3 que comprende exponer la célula tumoral a una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de PAC-1 y un segundo agente activo descrito en este documento, en donde la célula tumoral se trata, elimina, o inhibe su crecimiento. El tumor o las células tumorales pueden ser células tumorales malignas. Las células tumorales pueden ser células de linfoma, osteosarcoma o cáncer de mama.

PAC-1 puede combinarse con un segundo agente activo en una forma de dosificación unitaria para la administración a un paciente. La terapia de combinación puede administrarse como un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación se puede administrar en dos o más administraciones.

La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia", es decir, el efecto conseguido cuando los principios activos se utilizan juntos es mayor que la suma de los efectos resultantes de utilizar los compuestos de forma separada. Puede lograrse un efecto sinérgico cuando PAC-1 y un segundo agente activo se: (1) coformulan y administran, o suministran,

de manera simultánea en una formulación combinada; (2) se suministran de manera alternada o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) mediante alguna otra pauta. Cuando se administran en terapia alterna, puede conseguirse un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o se entregan secuencialmente, por ejemplo, en comprimidos, píldoras o cápsulas separados o mediante inyecciones distintas en jeringas separadas. En general, durante la terapia alterna, puede administrarse una dosis eficaz de cada ingrediente activo secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en la terapia de combinación, se administran juntas dosificaciones eficaces de dos o más principios activos. Un efecto anticancerígeno sinérgico indica un efecto anticancerígeno que es mayor que los efectos puramente aditivos predichos de los compuestos individuales de la combinación. La terapia de combinación se describe además en la patente de Estados Unidos n.º 6.833.373 (McKearn *et al.*), que incluye agentes activos adicionales que se pueden combinar con PAC-1 y tipos adicionales de cáncer y otras afecciones que se pueden tratar con PAC-1.

Por tanto, PAC-1 puede usarse en combinación con otro agente activo ("un segundo agente activo") para el tratamiento de cáncer. PAC-1 puede preceder o seguir a la administración del segundo agente activo en intervalos que varían de minutos a semanas. En realizaciones donde el segundo agente activo y PAC-1 se aplican por separado a la célula, generalmente se debería garantizar que no transcurra un período de tiempo significativo entre el momento de cada suministro, de manera que el agente y el PAC-1 aún puedan ejercer un efecto combinado ventajoso en la célula. Por ejemplo, en tales casos, se contempla que se pueda poner en contacto la célula, tejido u organismo con las dos modalidades sustancialmente simultáneamente (es decir, en menos de unos pocos minutos). En otros aspectos, el segundo agente activo de la combinación puede administrarse en aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 28 horas, aproximadamente 31 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 38 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 45 horas, o aproximadamente 48 horas o más, antes y/o después de administrar PAC-1. En determinadas otras realizaciones, el segundo agente activo puede administrarse en aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 16 días, aproximadamente 18 días, aproximadamente 20 días, o aproximadamente 21 días, antes y/o después de administrar PAC-1. En algunas situaciones, puede ser conveniente prolongar el período de tiempo para el tratamiento de manera significativa, sin embargo, donde varias semanas (por ejemplo, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 6, o aproximadamente 8 semanas o más) transcurren entre las respectivas administraciones.

La administración de las composiciones quimioterapéuticas de la invención a un paciente seguirá típicamente protocolos generales para administración de compuestos quimioterapéuticos, teniendo en cuenta la toxicidad, si las hubiera. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. También se contempla que varias terapias estándar o terapias complementarias contra el cáncer, así como intervención quirúrgica, puedan aplicarse en combinación con las combinaciones descritas. Estas terapias incluyen, pero sin limitación, quimioterapia, inmunoterapia, terapia génica y cirugía.

#### Formulaciones farmacéuticas

Los compuestos descritos en este documento pueden usarse para preparar composiciones farmacéuticas terapéuticas, por ejemplo, combinando los compuestos con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los compuestos pueden añadirse a un vehículo en forma de sal o solvato. Por ejemplo, en casos donde los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales o bases no tóxicas estables, la administración de los compuestos como sales puede ser apropiada. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son sales de adición de ácido orgánico formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metansulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato,  $\alpha$ -cetoglutarato, y  $\beta$ -glicerofosfato. También pueden formarse sales inorgánicas adecuadas, incluyendo clorhidrato, haluro, sulfato, nitrato, bicarbonato, y sales de carbonato.

Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse usando procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica, por ejemplo haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado para proporcionar un compuesto iónico fisiológicamente aceptable. También pueden prepararse sales de metal alcalino (por ejemplo, sales de sodio, potasio o litio) o metal alcalinotérreo (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos mediante métodos análogos.

Los compuestos descritos en este documento pueden formularse como composiciones farmacéuticas y administrarse a un hospedador mamífero, tal como un paciente humano, en una variedad de formas. Las formas pueden adaptarse específicamente a una ruta de administración elegida, por ejemplo, administración oral o parenteral, por vía intravenosa, intramuscular, tópica o subcutánea.

Los compuestos descritos en este documento pueden administrarse sistémicamente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, total como un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. La solubilidad de los agentes activos se puede aumentar mediante el uso de ciclodextrinas, tales como 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina. Para la administración oral, los compuestos pueden estar encerrados en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimidos en comprimidos, o incorporados directamente en los alimentos de la dieta de un paciente. Los compuestos también pueden combinarse con uno o más excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones contienen típicamente al menos 0,1 % de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede variar y puede ser convenientemente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 60 %, o de aproximadamente 2 % a aproximadamente 25 %, del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que puede obtenerse un nivel de dosificación eficaz.

Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener uno o más de los siguientes: aglutinantes tales como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similar; y un lubricante tal como estearato de magnesio. Un agente edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo; o un agente aromatizante tal como menta, aceite de gaulteria, o sabor a cereza, pueden añadirse. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Varios otros materiales pueden estar presentes como revestimientos o para modificar de otro modo la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas pueden estar revestidos con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y un aromatizante como sabor a cereza o naranja. Cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo puede incorporarse en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

El compuesto activo puede administrarse por vía intravenosa o intraperitoneal mediante infusión o inyección. Pueden prepararse soluciones del compuesto activo o sus sales en agua, opcionalmente mezcladas con un tensioactivo no tóxico. Se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina, o mezclas de los mismos, o en un aceite farmacéuticamente aceptable. En condiciones normales de almacenamiento y uso, las preparaciones pueden contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéutica adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones acuosas estériles, dispersiones, o polvos estériles que comprenden el ingrediente activo adaptado para preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables o infusibles estériles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. La última forma de dosificación debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un medio de dispersión solvente o líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, o usando tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tiomersal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones, o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y/o gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, opcionalmente seguido de esterilización con filtro. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación pueden incluir técnicas de secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional presente en las soluciones filtradas previamente estériles.

Las dosis útiles de los compuestos descritos en este documento se pueden determinar comparando su actividad *in vitro*, y actividad *in vivo* en modelos animales. Los métodos para la extrapolación de dosis eficaces en ratones, y otros animales, a seres humanos se conocen en la técnica; por ejemplo, véase la Patente de Estados Unidos n.º 4.938.949 (Borch *et al.*). La cantidad de un compuesto, o una sal activa o derivado del mismo, requerida para uso en tratamiento variará no solo con el compuesto o sal particular seleccionado sino también con la ruta de administración, la naturaleza de la afección que se está tratando, y la edad y afección del paciente, y quedará en última instancia a discreción de un médico o clínico asistente.

La combinación de compuestos puede administrarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, que contiene de 100 a 5.000 mg/m<sup>2</sup>, 300 a 4.000 mg/m<sup>2</sup>, 370 a 3.700 mg/m<sup>2</sup>, 50 a 750 mg/m<sup>2</sup>, o 750 a 4.000 mg/m<sup>2</sup> de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria. Cada compuesto, de forma individual o en combinación,

también puede administrarse a aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, o aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 100 mg/kg, o aproximadamente 150 mg/kg, o un intervalo de cualquiera de los valores mencionados anteriormente a cualquier otro de los valores mencionados anteriormente. Los compuestos también pueden administrarse a un sujeto para proporcionar una concentración plasmática en estado estacionario de los fármacos, solos o en combinación, de aproximadamente 1  $\mu\text{mol/l}$  a aproximadamente 25  $\mu\text{mol/l}$ , o aproximadamente 10  $\mu\text{mol/l}$ , o aproximadamente 15  $\mu\text{mol/l}$ .

En algunas realizaciones, la invención proporciona los compuestos en concentraciones eficaces de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ . En otra realización, las concentraciones eficaces son de aproximadamente 200 nM a aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 500 nM a aproximadamente 40  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 750 nM a aproximadamente 25  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 20  $\mu\text{M}$ , o aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ . En otra realización, la concentración eficaz se considera un valor tal como una concentración de actividad de 50 % en un ensayo de activación de procaspasa directa, en un ensayo de inducción de apoptosis celular o en una evaluación terapéutica clínica en animales. En una realización, dicho valor es menos de aproximadamente 200  $\mu\text{M}$ . En otra realización, el valor es menos de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  pero mayor que aproximadamente 10 nM. La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una dosis única o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis por día. La propia subdosis puede dividirse adicionalmente, por ejemplo, en una serie de administraciones discretas y poco espaciadas.

Los compuestos descritos en este documento pueden ser agentes antitumorales eficaces y tener una mayor potencia y/o toxicidad reducida en comparación con la administración de cualquier agente individual. En este documento se describen métodos terapéuticos para tratar cáncer en un mamífero, que implican administrar a un mamífero que tiene cáncer una cantidad eficaz de un compuesto o composición descrito en este documento. Un mamífero incluye un primate, ser humano, de roedor, canino, felino, bovino, ovino, equino, porcino, caprino, bovino y similares. El cáncer se refiere a cualquier tipo de neoplasia maligna, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de mama, melanoma y leucemia, entre otros descritos en este documento, y en general se caracteriza por una proliferación celular indeseable, por ejemplo, crecimiento no regulado, falta de diferenciación, invasión local de tejidos, y metástasis.

La capacidad de un compuesto de la invención para tratar cáncer puede determinarse usando ensayos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se conocen el diseño de protocolos de tratamiento, evaluación de toxicidad, análisis de datos, cuantificación de la eliminación de células tumorales e importancia biológica del uso de cree vados tumorales trasplantables. Además, la capacidad de un compuesto para tratar cáncer puede determinarse usando los ensayos descritos anteriormente y en las citas y documentos de patente citados en este documento.

También se describen en este documento, pero no forma parte de la invención como se define en las reivindicaciones anexas, formas de profármaco de los compuestos. Cualquier compuesto que se convierta *in vivo* para proporcionar PAC-1 u otro agente activo mencionado en este documento es un profármaco. Numerosos métodos de formación de profármacos se conocen bien en la técnica. Se encuentran ejemplos de profármacos y métodos para prepararlos, entre otras cosas, en Design of Prodrugs, editado por H. Bundgaard, (Elsevier, 1985), Methods in Enzymology, Vol. 42, en las páginas 309-396, editado por K. Widder, *et al.* (Academic Press, 1985); A Textbook of Drug Design and Development, editado por Krosgaard-Larsen y H. Bundgaard, Capítulo 5, "Design and Application of Prodrugs", de H. Bundgaard, en las páginas 113-191, 1991); H. Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 8, pág. 1-38 (1992); H. Bundgaard, *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 77, pág. 285 (1988); y Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, Nueva York, páginas 388-392).

Además, como se describe en este documento, pero no forma parte de la invención como se define en las reivindicaciones anexas, PAC-1 puede cambiarse por un derivado de PAC-1 u otro inhibidor, tal como un compuesto descrito en la Patente de Estados Unidos n.º 7.632.972 (Hergenrother *et al.*), las publicaciones de Patente de Estados Unidos n.º 2012/0040995 (Hergenrother *et al.*) Y 2007/0049602 (Hergenrother *et al.*), y la Solicitud de Estados Unidos n.º de Serie 12/597.287 (Hergenrother *et al.*). Los compuestos útiles, métodos y técnicas para terapia del cáncer que pueden usarse en combinación con la divulgación descrita en este documento se describen en los documentos mencionados anteriormente, así como en las Patentes de Estados Unidos n.º 6.303.329 (Heinrikson *et al.*), 6.403.765 (Alnemri), 6.878.743 (Choong *et al.*) Y 7.041.784 (Wang *et al.*), y la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2004/0180828 (Shi).

Los métodos para realizar los ensayos y evaluar las líneas celulares de cáncer se pueden realizar según lo descrito en Putt *et al.*, Nature Chemical Biology 2006, 2(10), 543-550; Peterson *et al.*, J. Mol. Biol. 2009, 388, 144-158; y Peterson *et al.*, Cancer Res. 2010, 70(18), 7232-7241.

El siguiente ejemplo está destinado a ilustrar la invención anterior y no debe interpretarse como una limitación de su alcance. Un experto en la materia reconocerá fácilmente que los ejemplos sugieren muchas otras formas en que se podría practicar la invención. Debe entenderse que pueden realizarse numerosas variaciones y modificaciones mientras permanecen dentro del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones anexas.

## Ejemplos

## Ejemplo 1. Formas de dosificación farmacéuticas

5 Las siguientes formulaciones ilustran formas de dosificación farmacéuticas representativas que pueden usarse para administración terapéutica o profiláctica de los compuestos de combinación descritos en este documento (por ejemplo, PAC-1 y el segundo agente activo), o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos (en lo sucesivo denominados "Compuestos X"):

(i) Comprimido 1	mg/comprimido
"Compuestos X"	200,0
Lactosa	77,5
Povidona	15,0
Croscarmelosa de sodio	12,0
Celulosa microcristalina	92,5
Estearato de magnesio	3,0
	<hr/> 400,0

10

(ii) Comprimido 2	mg/comprimido
"Compuestos X"	120,0
Celulosa microcristalina	410,0
Almidón	50,0
Almidón glicolato sódico	15,0
Estearato de magnesio	5,0
	<hr/> 600,0

(iii) Cápsula	mg/cápsula
"Compuestos X"	110,0
Dióxido de silicio coloidal	1,5
Lactosa	465,5
Almidón pregelatinizado	120,0
Estearato de magnesio	3,0
	<hr/> 700,0

(iv) Inyección 1 (1 mg/ml)	mg/ml
"Compuestos X"	1,0
Fosfato sódico dibásico	12,0
Fosfato sódico monobásico	0,7
Cloruro sódico	4,5
Solución de hidróxido sódico 1,0 N (ajuste de pH a 7,0-7,5)	c.s.
Agua para inyección	c.s. hasta 1 ml

(v) Inyección 2 (10 mg/ml)	mg/ml
"Compuestos X"	10,0
Fosfato sódico monobásico	0,3
Fosfato sódico dibásico	1,1
Polietilenglicol 400	200,0
Solución de hidróxido sódico 0,1 N (ajuste de pH a 7,0-7,5)	c.s.
Agua para inyección	c.s. hasta 1 ml

(vi) Aerosol	mg/lata
"Compuestos X"	20
Ácido oleico	10
Tricloromonofluorometano	5.000
Diclorodifluorometano	10.000
Diclorotetrafluoroetano	5.000

15

Estas formulaciones pueden prepararse mediante procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica farmacéutica. Se entenderá que las composiciones farmacéuticas anteriores pueden variarse según técnicas farmacéuticas bien conocidas para acomodar diferentes cantidades y tipos de los ingredientes activos "Compuestos X". La formulación en aerosol (vi) puede usarse junto con un dispensador de aerosol de dosis medida convencional.

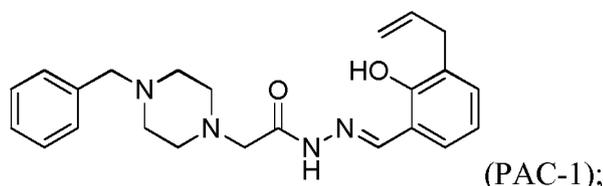
Además, los ingredientes y proporciones específicos son con fines ilustrativos. Los ingredientes pueden cambiarse por equivalentes adecuados y las proporciones pueden variar, según las propiedades deseadas de la forma de dosificación de interés.

- 5 Aunque las realizaciones específicas se han descrito anteriormente por referencia a realizaciones y ejemplos desvelados, tales realizaciones son solo ilustrativas y no limitan el alcance de la invención. Pueden hacerse cambios y modificaciones según la habilidad ordinaria en la técnica sin apartarse de la invención en sus aspectos más amplios como se define en las siguientes reivindicaciones.
- 10 La invención se ha descrito por referencia a diversas realizaciones y técnicas específicas y preferentes. Sin embargo, debe entenderse que pueden hacerse numerosas variaciones y modificaciones mientras permanecen dentro del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

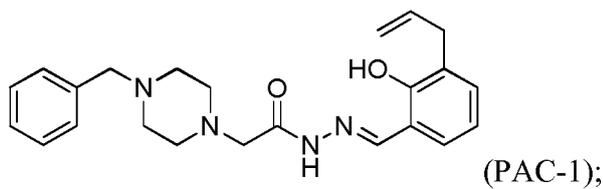
5 (a) un compuesto PAC-1:



10 (b) un segundo agente activo, en donde el segundo agente activo es bortezomib, doxorubicina, tamoxifeno, carboplatino, o paclitaxel; y  
(c) un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

2. Una composición que comprende:

15 (a) un compuesto PAC-1:



20 (b) un segundo agente activo, en donde el segundo agente activo es estaurosporina; y  
(c) un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable;

en donde la concentración del compuesto PAC-1 es 7,5 o 15  $\mu\text{M}$  y la concentración de estaurosporina es 50 nM o 100 nM; o

en donde la concentración del compuesto PAC-1 es 30  $\mu\text{M}$  y la concentración de estaurosporina es 50 nM.

25 3. La composición de la reivindicación 1 o 2 en donde el vehículo comprende agua y opcionalmente un tampón, una ciclodextrina, o una combinación de los mismos  
en donde, opcionalmente, la ciclodextrina es 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina.

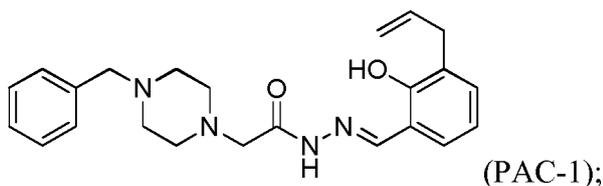
30 4. La composición de la reivindicación 1 en donde la concentración del compuesto PAC-1 es 2  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ .

5. La composición de la reivindicación 1 en donde la concentración de bortezomib, doxorubicina, tamoxifeno, carboplatino, o paclitaxel es 1 nM a 1 mM.

35 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4  
en donde el segundo agente activo es bortezomib y la concentración de bortezomib es 50 nM a 20  $\mu\text{M}$ , o  
en donde el segundo agente activo es doxorubicina y la concentración de doxorubicina es 50 nM a 5  $\mu\text{M}$ , o  
en donde el segundo agente activo es tamoxifeno y la concentración de tamoxifeno es 1  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ , o  
en donde el segundo agente activo es carboplatino y la concentración de carboplatino es 5  $\mu\text{M}$  a 150  $\mu\text{M}$ , o  
40 en donde el segundo agente activo es paclitaxel y la concentración de paclitaxel es 0,5 nM a 15 nM.

7. Una combinación de un compuesto PAC-1 y un segundo agente activo para uso en tratamiento de un cáncer en un paciente, en donde la combinación es una cantidad eficaz de

45 (a) el compuesto PAC-1:



(b) el segundo agente activo, en donde el segundo agente activo es bortezomib, doxorubicina, tamoxifeno, carboplatino, o paclitaxel; y

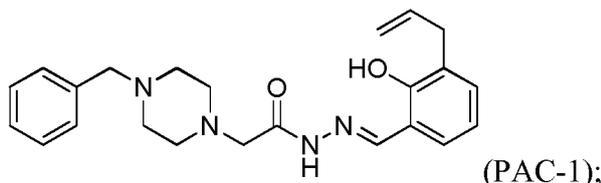
5 (c) un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable; y

en donde dicho uso comprende poner en contacto células cancerosas, simultánea o secuencialmente, con una cantidad eficaz del compuesto PAC-1 y el segundo agente activo, inhibiendo así el crecimiento o la proliferación de células cancerosas.

10 8. Una combinación de un compuesto PAC-1 y un segundo agente activo para uso en tratamiento de un cáncer en un paciente, en donde la combinación es una cantidad eficaz de

(a) el compuesto PAC-1:

15



(b) el segundo agente activo, en donde el segundo agente activo es estaurosporina; y

(c) un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable;

20 en donde dicho uso comprende poner en contacto células cancerosas, simultánea o secuencialmente, con una cantidad eficaz del compuesto PAC-1 y el segundo agente activo, inhibiendo así el crecimiento o la proliferación de las células cancerosas; y

25 en donde la concentración del compuesto PAC-1 es 7,5 o 15  $\mu\text{M}$  y la concentración de estaurosporina es 50 nM o 100 nM; o en donde la concentración del compuesto PAC-1 es 30  $\mu\text{M}$  y la concentración de estaurosporina es 50 nM.

9. La combinación del compuesto PAC-1 y el segundo agente activo para uso según la reivindicación 7 u 8, en donde las células cancerosas son células de linfoma, células de osteosarcoma, células de cáncer de mama, o células de carcinoma de ovario.

30 10. La combinación del compuesto PAC-1 y el segundo agente activo para uso según la reivindicación 7 u 8, en donde poner en contacto las células cancerosas con el compuesto PAC-1 y el segundo agente activo induce apoptosis en dichas células cancerosas.

35 11. La combinación del compuesto PAC-1 y el segundo agente activo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde la célula cancerosa se pone en contacto con el compuesto PAC-1 y el segundo agente activo simultáneamente.

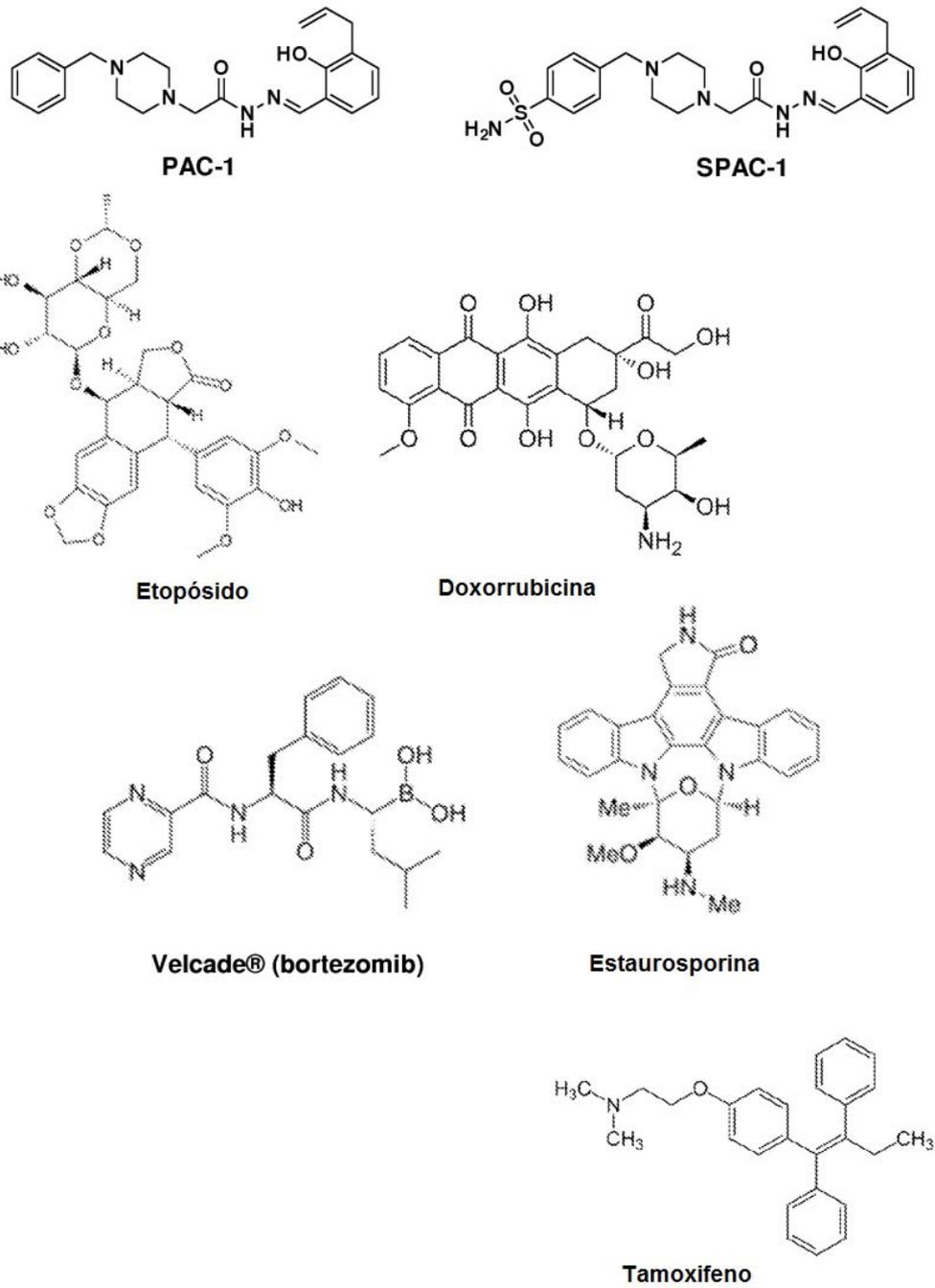
40 12. La combinación del compuesto PAC-1 y el segundo agente activo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde la célula cancerosa se pone en contacto con el compuesto PAC-1 antes de poner en contacto la célula cancerosa con el segundo agente activo.

45 13. La combinación del compuesto PAC-1 y el segundo agente activo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde la célula cancerosa se pone en contacto con el compuesto PAC-1 después de poner en contacto la célula cancerosa con el segundo agente activo.

14. La combinación del compuesto PAC-1 y el segundo agente activo para uso según la reivindicación 7 u 8, en donde el cáncer es linfoma, osteosarcoma, cáncer de mama, o carcinoma de ovario.

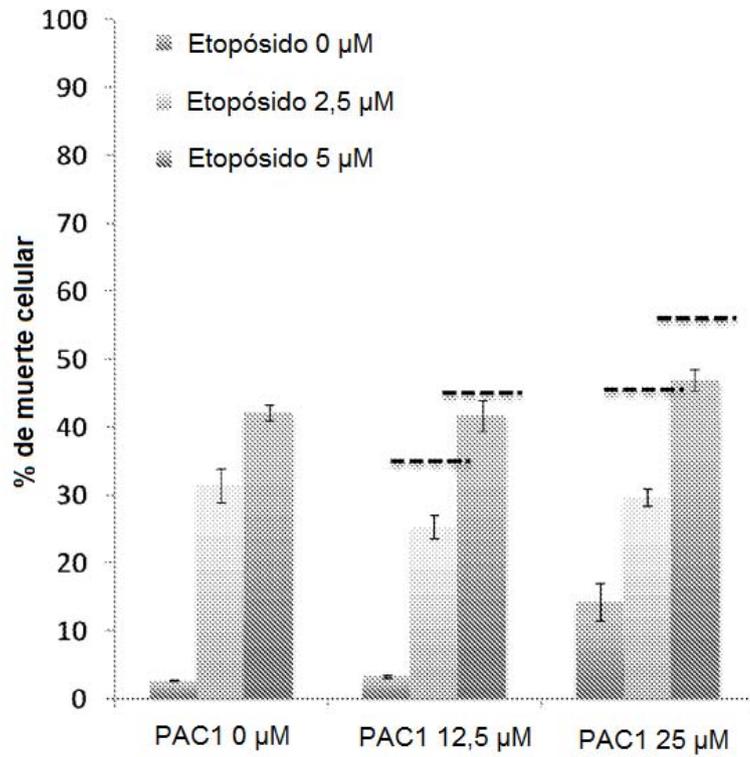
50 15. La composición de la reivindicación 4 o la combinación del compuesto PAC-1 y el segundo agente activo para uso de la reivindicación 7 en donde la concentración del compuesto PAC-1 es 15  $\mu\text{M}$  a 30  $\mu\text{M}$ .

16. La composición de la reivindicación 6 o la combinación del compuesto PAC-1 y el segundo agente activo para uso de la reivindicación 7,
- 5 en donde la concentración del compuesto PAC-1 es 15 o 30  $\mu\text{M}$ , el segundo agente activo es bortezomib y la concentración de bortezomib es 100 nM, 1  $\mu\text{M}$  o 5  $\mu\text{M}$ ; o
- en donde la concentración del compuesto PAC-1 es 10 o 20  $\mu\text{M}$ , el segundo agente activo es doxorubicina y la concentración de doxorubicina es 100 nM, 300 nM o 1000 nM; o
- en donde la concentración del compuesto PAC-1 es 15 o 30  $\mu\text{M}$ , el segundo agente activo es tamoxifeno y la concentración de tamoxifeno es 2,5  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ ; o
- 10 en donde la concentración del compuesto PAC-1 es 15 o 30  $\mu\text{M}$ , el segundo agente activo es carboplatino y la concentración de carboplatino es 25  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ; o
- en donde la concentración del compuesto PAC-1 es 15 o 30  $\mu\text{M}$ , el segundo agente activo es paclitaxel y la concentración de paclitaxel es 1 nM o 3 nM.



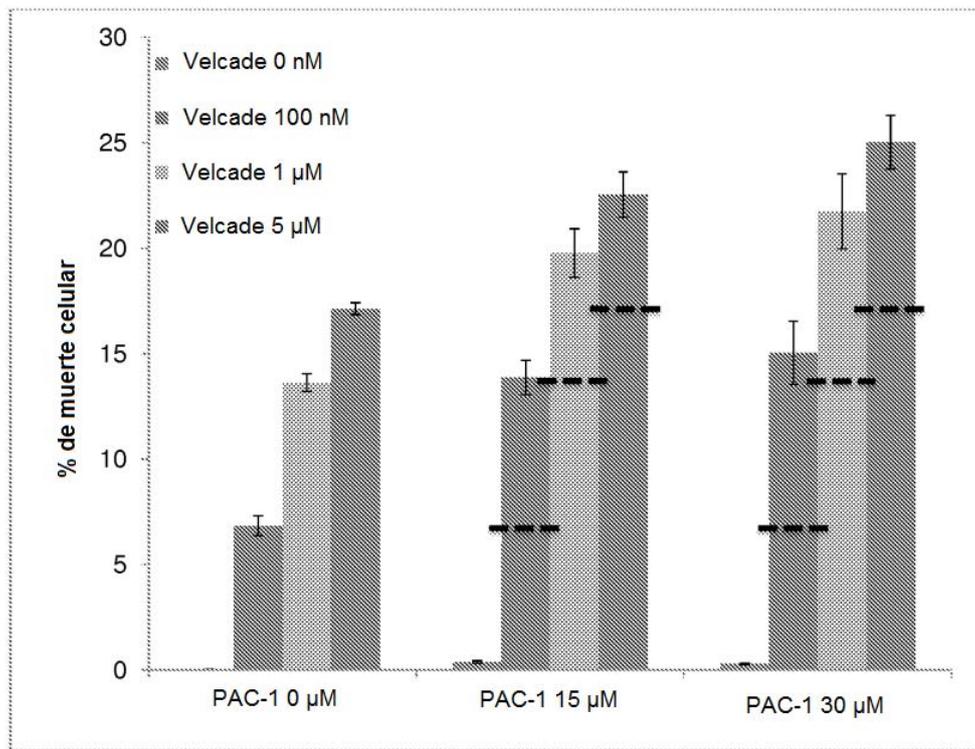
**Figura 1**

Muerte celular de U-937 (linfoma)



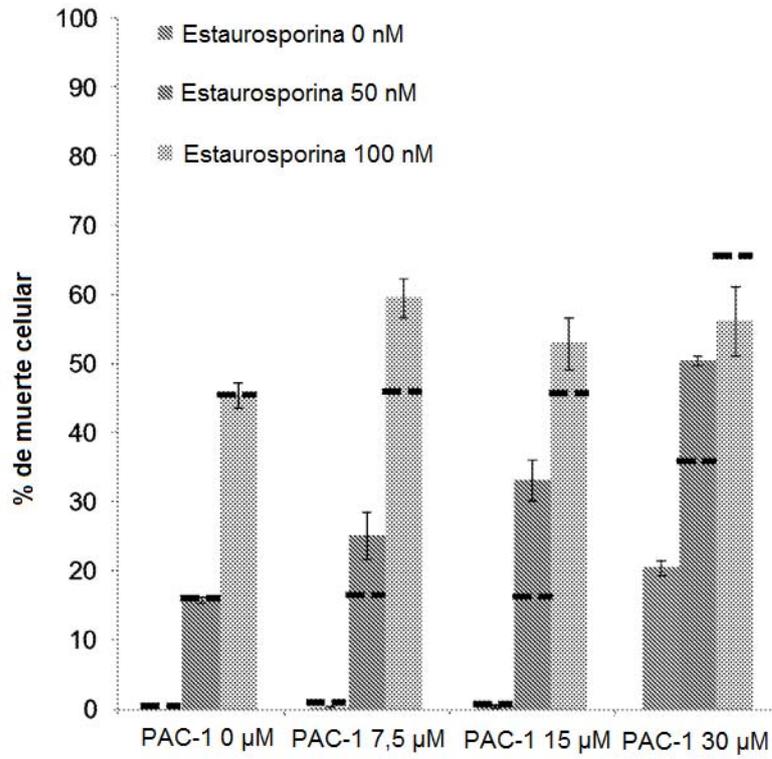
**Figura 2**

Muerte celular de U-937 (linfoma)



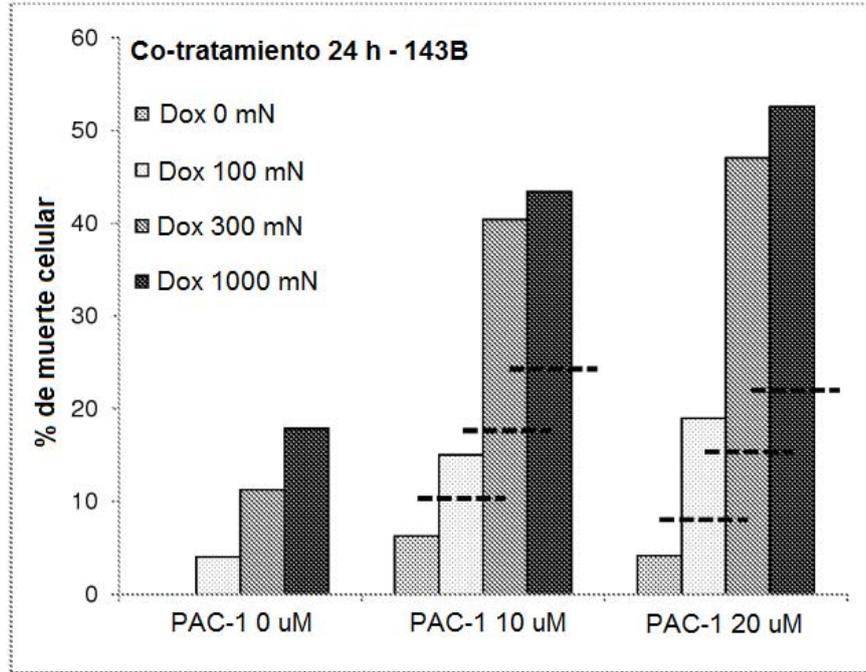
**Figura 3**

Muerte celular de U-937 (linfoma)



**Figura 4**

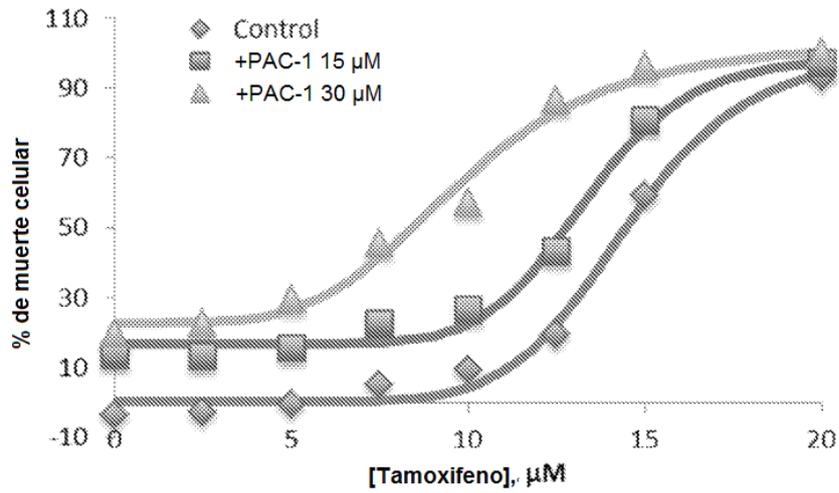
Muerte celular de osteosarcoma 143B (OS humano)



**Figura 5**

Muerte celular de BT20 (cáncer de mama triple negativo)

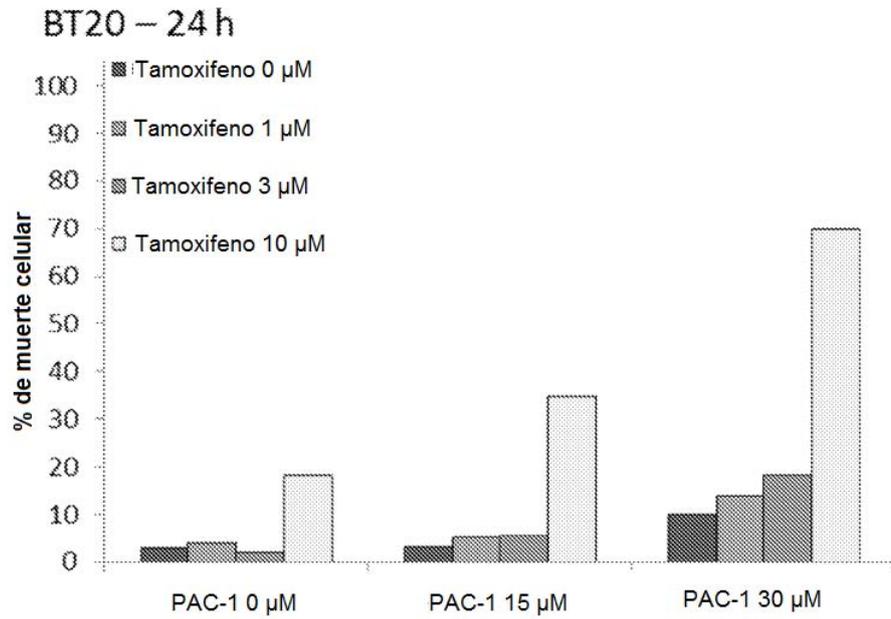
Potenciación de PAC-1 de tamoxifeno en BT20:  
(36 h, evaluado mediante SRB, 1 rep)



Condiciones	CI50 ( $\mu\text{M}$ )
Control	14,5
+PAC-1 15 $\mu\text{M}$	13,3
+PAC-1 30 $\mu\text{M}$	9,81

**Figura 6**

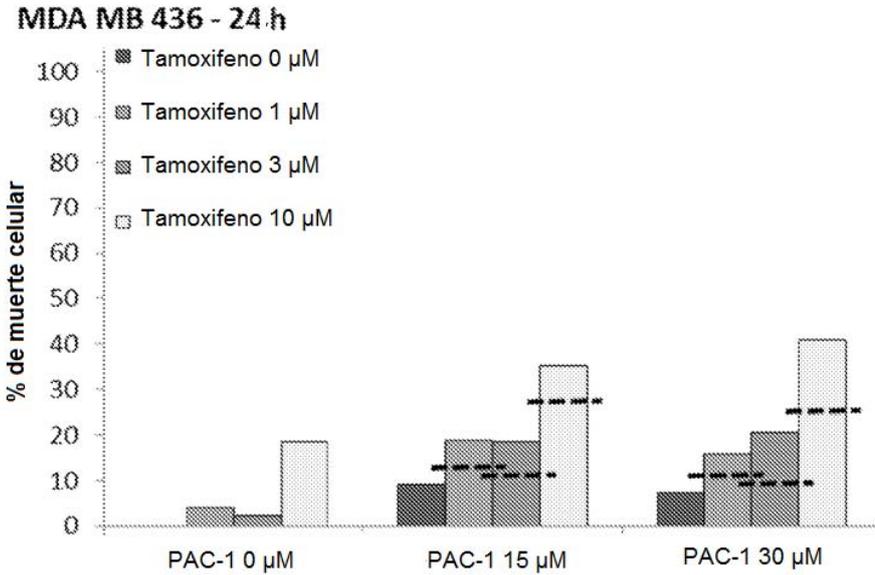
Muerte celular de BT20 (cáncer de mama triple negativo)



	PAC-1 0 μM	PAC-1 15 μM	PAC-1 30 μM
Tamoxifeno 0 μM	2,74	3,23	9,90
Tamoxifeno 1 μM	3,97	5,22	13,65
Tamoxifeno 3 μM	1,98	5,58	18,36
Tamoxifeno 10 μM	18,36	34,62	69,91

**Figura 7**

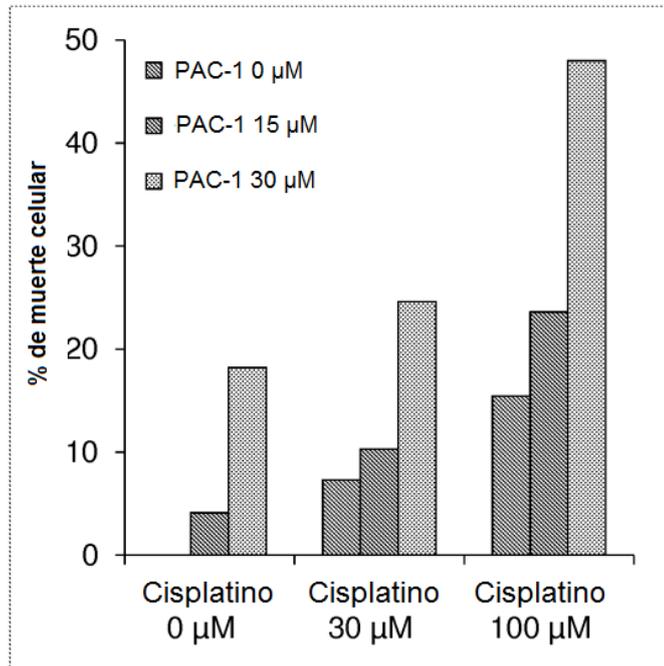
Muerte celular de MDA MB 436 (cáncer de mama triple negativo)



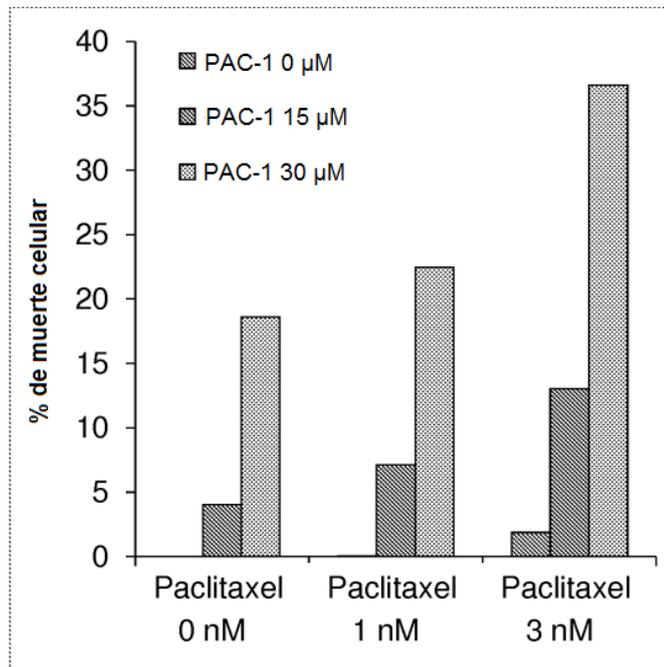
MDA-MB-436 son células de 14 subgrupos

	PAC-1 0 μM	PAC-1 15 μM	PAC-1 30 μM
Tamoxifeno 0 μM	-3,70	9,15	7,38
Tamoxifeno 1 μM	3,94	18,75	15,98
Tamoxifeno 3 μM	2,19	18,38	20,59
Tamoxifeno 10 μM	18,62	35,37	41,01

**Figura 8**

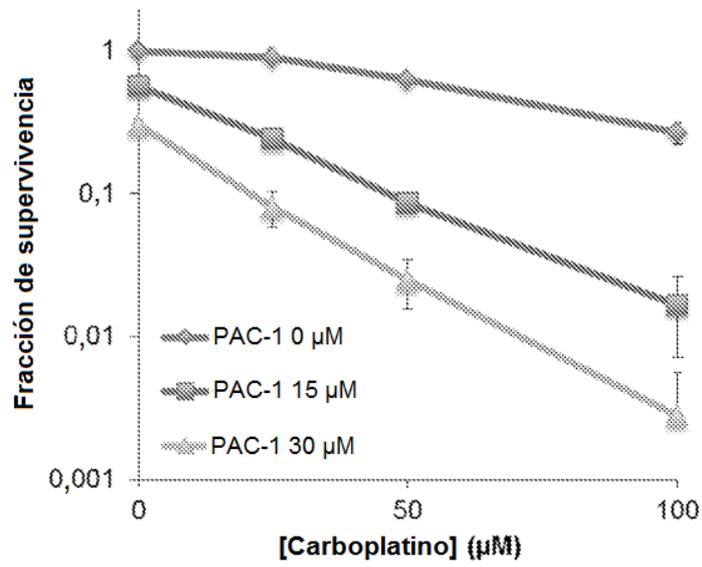


**Figura 9**



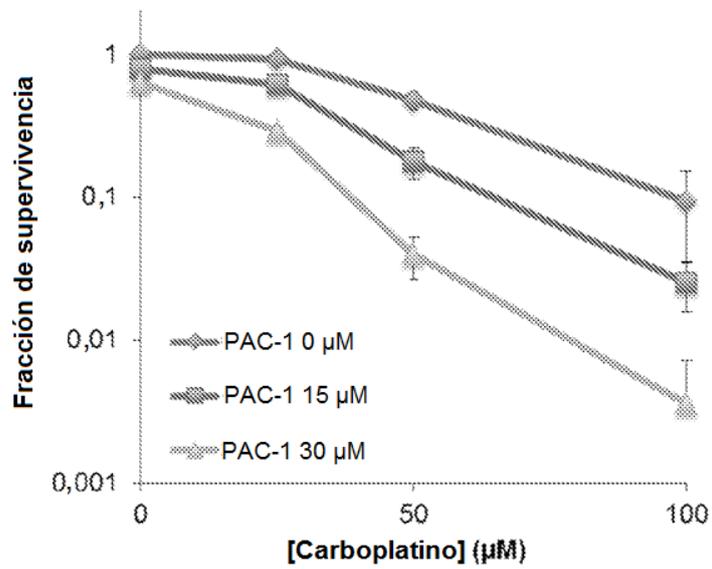
**Figura 10**

**HOS (osteosarcoma humano):**



**Figura 11**

**143B (osteosarcoma humano):**



**Figura 12**